

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Identificación y caracterización de C/EBP β y GSK-3 β como posibles nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de glioblastomas

Tesis Doctoral

Diana Aguilar Morante

Madrid, 2011

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Identificación y caracterización de C/EBP β y GSK-3 β como posibles nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de glioblastomas

Diana Aguilar Morante

Licenciada en Bioquímica

Directora de Tesis: Dra. Ana María Pérez Castillo

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”
CSIC-UAM



MINISTERIO
DE CIENCIA E
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"ALBERTO SOLS"

Ana María Pérez Castillo, Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid,

Certifico que:

Diana Aguilar Morante, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado su Tesis Doctoral titulada **"Identificación y caracterización de C/EBP β y GSK-3 β como posibles nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de glioblastomas"** bajo mi dirección, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM).

Considero que la presente Tesis Doctoral reúne las condiciones de originalidad y rigor necesarios y se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,

En Madrid, a 15 de Abril de 2011.

Dra. Ana Mª Pérez Castillo
Directora de Tesis
Profesora de Investigación, CSIC
CIBERNED

VºBº Dra. Rosario Perona Abellón
Tutora de Tesis
Profesora Honoraria del Dpto. de Bioquímica,
Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

Quería dar las gracias en primer lugar a “mi jefa” la Dra Ana María Pérez Castillo, por darme la oportunidad de entrar en el laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto y en segundo lugar al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por haberme concedido la beca predoctoral I3P que me ha permitido desarrollar este trabajo.

Sin olvidarme de mis compañeros y mi familia que me han apoyado en todo momento.

A todos muchas gracias.

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM, OMS-grado IV) es el tumor cerebral primario más frecuente y maligno con una supervivencia media de menos de un año tras su diagnóstico. Este tumor se define por presentar proliferación celular descontrolada, infiltración difusa en el tejido adyacente, focos de necrosis, elevada angiogénesis y una fuerte resistencia a la apoptosis además de una elevada inestabilidad cromosómica. Debido a que los GBM son resistentes a los protocolos terapéuticos actuales, incluyendo la radioterapia y que la cirugía no es capaz de eliminar por completo el tumor, debido a su naturaleza infiltrante, las terapias actuales solo llevan a una mejora temporal y limitada, poniendo de manifiesto que es necesario el desarrollo de nuevos enfoques en el tratamiento del GBM. En base a estos datos, en este trabajo se ha estudiado el papel del factor de transcripción CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β) y la enzima glucógenos sintasa quinasa 3β (GSK- 3β) como posibles nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de los GBM. Nuestros resultados demuestran que una bajada en los niveles de proteína de C/EBP β por RNA de interferencia, inhibe la proliferación de diferentes líneas de glioblastoma, induce parada del ciclo celular en la fase G0/G1 y disminuye su capacidad de transformación y migración. Además, hemos observado que C/EBP β regula la expresión de varios genes relacionados con respuesta a daño en el DNA, invasión y metastasis, tales como S100A4. A su vez, la disminución de C/EBP β retarda significativamente la aparición del tumor y mejora el pronóstico de supervivencia en un modelo ortotópico de ratón de tumor cerebral. Paralelamente a estos resultados, hemos observado que la inhibición de la enzima GSK- 3β por el compuesto tiadiazolidinona TDZD-8, disminuye la proliferación e induce apoptosis en células de GBM *in vitro*, además de inducir un retraso en el crecimiento tumoral *in vivo* y un aumento en la supervivencia de los animales. Estos efectos se asocian con la regulación de diferentes rutas de señalización. Por una parte, la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y el incremento en la expresión de los genes EGR-1 y p21. Por otro lado, la inhibición de GSK- 3β por fosforilación en Ser 9 a través de la activación de la quinasa ribosomal S6 (p90RSK). Y por último, la disminución en la actividad de NF- κ B y la activación de PPAR γ .

Finalmente, diversos estudios demuestran que los GBM pueden provenir de las poblaciones de células madre neurales transformadas caracterizadas por poseer un potencial ilimitado de auto-renovación y diferenciación aberrante. En este trabajo se muestra que tanto la disminución en la expresión de C/EBP β por RNA de interferencia como la inhibición de GSK- 3β por TDZD-8 además de afectar al crecimiento de la masa tumoral, caracterizada por una proliferación activa, afecta a la formación y auto-renovación de las células madre del cáncer, que se caracterizan por presentar una baja tasa de división y por tanto son refractarias a las terapias convencionales.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM, WHO grade IV) is the deadliest and most common type of human primary brain tumor with a median survival of less than one year. This tumor is defined by the hallmark features of uncontrolled cellular proliferation, diffuse infiltration, propensity for necrosis, robust angiogenesis, intense resistance to apoptosis and rampant genomic instability. Two characteristic features of glioblastoma are first, that glioblastoma cells extensively invade the surrounding areas, which essentially prevents a surgical cure, and second, that glioblastomas are resistant to all the current therapeutic modalities, including radiotherapy. As the current therapies only lead to very temporarily limited improvement, new approaches to treat glioblastomas need to be developed. Based on these data, in this work we have investigated the role of the transcription factor C/EBP β and the enzyme GSK-3 β as novel therapeutic targets for the treatment of glioblastomas. Here, we show that down-regulation of C/EBP β by RNA interference inhibits proliferation in different glioblastomas cell lines, induces arrest of the cycle at the G0/G1 boundary and diminishes their transformation capacity and migration. In addition, we observed that C/EBP β regulates the expression of several DNA damage response, invasion and metastasis related genes, such as S100A4. Lastly, C/EBP β depletion significantly retards tumor onset and improves prognosis survival in murine orthotopic brain tumor model. In parallel to these findings, we have found that the inhibition of GSK-3 β , by the thiadiazolidinone compound TDZD-8, decreased proliferation and induced apoptosis of glioblastomas cells *in vitro*, delayed tumor growth *in vivo* and augmented animal survival. These effects were associated with different pathways. On one hand, the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and increased expression of EGR-1 and p21 genes. Also, an inhibition of GSK-3 β by phosphorylation at Ser 9 through activation of ribosomal S6 kinase (p90RSK). And, finally, the diminution of NK- κ B activity and activation of PPAR γ .

Finally, there is increasing evidence that gliomas can originate from neural stem cell populations, which are bestowed with a potential for self-renewal and aberrant differentiation. In this work, we also present results indicating that both, down-regulation of C/EBP β by RNA interference and inhibition of GSK-3 β by TDZD-8, result not only in an inhibition of the bulk of the tumor, characterized by actively cycling cells, but also in a inhibition of the capacity of growth and self-renewal of neural cancer stem cells, characterized by a low rate of division, and therefore refractory to conventional therapies.

In summary, we have presented here the first evidence that depletion of C/EBP β expression and inhibition of GSK-3 β by TDZD-8 inhibits gliomagenesis and targets glioma stem-like cells, and consequently may hold promise for future treatments of human glioblastomas.

Índice

Agradecimientos	III
Resumen	VII
Abstract	XI
Índice	3
Clave de Abreviaturas	9
Introducción	13
1. Tumores cerebrales: Glioblastomas	13
1.1. Clasificación y bases moleculares del glioblastoma	14
1.2. Origen del glioblastoma y células madre del cáncer	15
1.3. Terapias para el tratamiento del glioblastoma	17
2. CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBPβ)	19
2.1. Estructura e isoformas de C/EBP β	19
2.2. Modificaciones postraduccionales de C/EBP β	21
2.3. Funciones de C/EBP β	22
2.4. Papel de C/EBP β en el desarrollo de tumores	23
3. Proteína de unión a calcio: S100A4	24
4. Glucógeno Sintasa Quinasa-3 (GSK-3)	26
4.1. Estructura de GSK-3	26
4.2. Regulación de GSK-3 β	28
4.2.1. Fosforilación en serina 9	28
4.2.2. Fosforilación en tirosina 216	29
4.3. Papel de GSK-3 β en el desarrollo de tumores	29
4.4. Inhibidores de GSK-3 β y su relevancia terapéutica	30
Objetivos	35
Materiales y Métodos	39
1. Cultivos celulares	39
2. Generación de líneas celulares estables: transfección estable e infección lentiviral	40
3. Clonaje del promotor del gen S100A4 de ratón en el plásmido pGL4.10	41
4. Mutagénesis dirigida	42
5. Transfecciones transitorias	43
6. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	44
7. Ensayos de proliferación, viabilidad y ciclo celular	45

8. Inmunocitoquímica.....	47
9. Análisis de apoptosis.....	47
10. Ensayo de crecimiento en agar blando.....	47
11. Ensayo de cicatrización de “herida” en placa.....	48
12. Ensayo de invasividad.....	48
13. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección (<i>Western Blot</i>).....	48
14. RT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.....	50
15. Análisis de la expresión génica (PCR-Array).....	50
16. Inducción de glioblastomas <i>in vivo</i> mediante inyección estereotáxica en ratones.....	51
17. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	52
18. Histología e Inmunohistoquímica.....	52
19. Estadística.....	53
Resultados.....	57
1. C/EBPβ como posible nueva diana para el tratamiento de glioblastomas.....	57
1.1. La interferencia de C/EBP β disminuye la proliferación y viabilidad de las células de glioblastoma.....	57
1.2. La interferencia de C/EBP β disminuye la capacidad de las células de glioblastoma de crecer de forma independiente de anclaje.....	61
1.3. La interferencia de C/EBP β disminuye la motilidad y la capacidad de invasión de las células de glioblastoma.....	62
1.4. Estudio de los genes implicados en los efectos de la interferencia de C/EBP β sobre la disminución de la proliferación, viabilidad y capacidad invasiva de las células GL261.....	64
1.5. La interferencia de C/EBP β disminuye el crecimiento de las células GL261 <i>in vivo</i>	65
1.6. La interferencia de C/EBP β <i>in vitro</i> disminuye la formación y la auto-renovación de las células madre derivadas de glioblastoma.....	68
1.7. Regulación del gen S100A4 por el factor de transcripción C/EBP β	71
2. GSK-3β como posible nueva diana en el tratamiento de glioblastomas.....	74
2.1. TDZD-8 disminuye la proliferación y viabilidad celular <i>in vitro</i> de células de glioblastoma de ratón y humano.....	75
2.2. Estudio del mecanismo de acción implicado en los efectos de TDZD-8 en células de glioblastoma.....	78

2.3. Efecto de TDZD-8 sobre la actividad transcripcional del receptor activado por proliferadores peroxisomales PPAR γ y su implicación en la supervivencia de las células de glioblastoma GL261	81
2.4. Efecto de TDZD-8 sobre la formación y auto-renovación de las células madre del glioblastoma <i>in vitro</i>	83
2.5. El tratamiento con TDZD-8 retrasa el desarrollo del glioblastoma <i>in vivo</i>	85
Discusión	93
Conclusiones	109
Bibliografía	113
Anexo	131

Clave de Abreviaturas

GBM: Glioblastoma multiforme

cDNA: DNA complementario

mRNA: RNA mensajero

BrdU: Bromodesoxiuridina

C/EBP β : *CCAAT/Enhancer Binding Protein β*

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

CSC: Células madre del cáncer (*Cancer Stem Cells*)

DS: Desviación estándar

GSK-3 β : Glucógeno Sintasa Quinasa 3 β

LPS: Lipopolisacarido

MGMT: metilguanina-metiltransferasa

NSFG: Neuroesferas derivadas del glioblastoma

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

shRNA: Horquillas cortas de RNA (*Short Hairpin RNA*)

15d-PDJ₂: 15-deoxi- Δ^{12-14} -Protaglandina J₂

TDZDs: tiadiazolidinonas

TDZD-8: *4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione*

TMZ: temozolomida

Introducción

1. Tumores cerebrales: Glioblastomas

Actualmente se conocen más de 120 tipos de tumores cerebrales, según la *Nacional Brain Tumors Society* y son clasificados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a partir de su origen celular y su comportamiento, desde poco agresivo (benigno) a muy agresivo (maligno). Según la OMS los tumores cerebrales primarios han sido tradicionalmente clasificados de acuerdo con sus características morfológicas en función del posible origen celular del tejido neoplásico. Los tumores de origen neuroepitelial engloban un subgrupo de neoplasias conocidas como gliomas, que derivarían de las células de glia necesarias para el mantenimiento, protección y nutrición de las neuronas. Los gliomas representan más de la mitad de los tumores cerebrales y engloban un amplio espectro que va desde los tumores con bajo grado de proliferación e infiltración a los tejidos adyacentes, a tumores altamente agresivos. Se clasifican a su vez en diferentes tipos como son los ependimomas, oligodendrogliomas y astrocitomas. A su vez los astrocitomas pueden clasificarse en 4 grados según sus características histológicas: grado I (astrocitomas pilocíticos), grado II (astrocitomas difusos), grado III (astrocitomas anaplásicos) y grado IV (glioblastoma multiforme, GBM) (Louis et al., 2007). Los GBM constituyen aproximadamente el 50 % de los gliomas así como un 20 % de los tumores intracraneales. El término “multiforme” hace referencia a su heterogeneidad intratumoral a nivel citopatológico, transcripcional y genómico, constituyendo uno de los mayores problemas para su clasificación. Estos tumores podrían tener un origen glial (normalmente astrocítico) y se caracterizan por presentar una proliferación celular incontrolada, focos de necrosis, gran capacidad de angiogénesis, resistencia a la apoptosis, una elevada inestabilidad genética e infiltraciones difusas en las áreas circundantes, haciendo que las intervenciones quirúrgicas para su eliminación sean ineficaces (Furnari et al., 2007). En la actualidad, son considerados los tumores con mayor grado de malignidad entre los astrocitomas, presentando una supervivencia media de un año tras su diagnóstico (Ohgaki, 2009).

Los GBM rara vez provocan metástasis fuera del tejido nervioso, únicamente tienden a infiltrarse en el tejido normal adyacente. Sin embargo, distintos tipos de tumores si metastatizan al cerebro dando lugar a las denominadas metástasis cerebrales o tumores cerebrales metastásicos. La metástasis cerebral ocurre entre un 15 y un 20% de los pacientes con cáncer y es 10 veces más frecuente que los tumores cerebrales primarios. El cáncer de pulmón y el cáncer de mama, son las principales fuentes de metástasis cerebral,

seguidos por el melanoma y el cáncer colorrectal (Soffietti et al., 2002; Aragon-Ching and Zujewski, 2007; Eichler et al., 2011).

1.1 Clasificación y bases moleculares del glioblastoma

Los GBM pueden clasificarse principalmente en dos tipos, “*de novo*” y secundarios, en base a sus diferencias genéticas y biológicas (Furnari et al., 2007; Ohgaki and Kleihues, 2007) (Figura I). La denominación “blastoma”, hace referencia al gran contenido de células escasamente diferenciadas en este tipo de tumores.

Los GBM “*de novo*” aparecen normalmente en personas mayores de 50 años. Estos GBM están caracterizados por la amplificación, sobreexpresión y mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la pérdida de la heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10q, mutaciones en la fosfatasa PTEN y la delección o hipermetilación de $p16^{Ink4a}$ (CDKN2A, inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclinas).

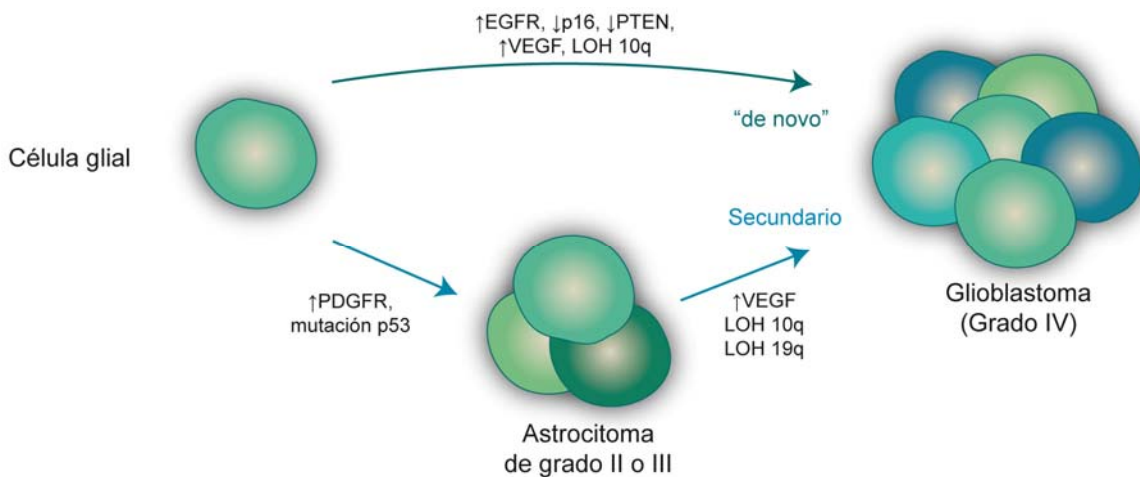


Figura I. Representación esquemática de las distintas vías de desarrollo del glioblastoma (GBM). Los subtipos de GBM: “*de novo*” y secundarios, se distinguen principalmente en sus alteraciones genéticas. Ambos son histológicamente indistinguibles y con una prevalencia diferente en distintos grupos de edad. Presentan distintas alteraciones genéticas que implican diversas rutas moleculares, algunas de ellas comunes.

Los GBM secundarios o progresivos están caracterizados sin embargo por presentar mutaciones en el gen supresor de tumores p53, sobreexpresión en el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10q y 19q (LOH 10q y 19q). Estos tumores aparecen como astrocitomas difusos de bajo grado (OMS-Grado II) o astrocitomas anaplásicos (OMS-Grado III) en pacientes jóvenes que se transforman de manera paulatina en GBM de Grado IV. El tiempo de progresión entre el astrocitoma de grado II y el glioblastoma suele ser de 5,3 años y entre el astrocitoma de grado III y el glioblastoma de grado IV 1,4 años (Ohgaki and

Kleihues, 2005). Los GBM secundarios son menos frecuentes que los “de novo” (un 10% frente a un 90%, respectivamente) y a pesar de sus diferencias genéticas, son morfológica e histológicamente indistinguibles respondiendo de una manera similar a la terapia convencional, aunque pueden presentar respuestas diferentes a terapias moleculares dirigidas (Wen and Kesari, 2008).

1.2 Origen del glioblastoma y células madre del cáncer

Las bases genéticas y las rutas de señalización implicadas en el desarrollo de los glioblastomas se encuentran relativamente bien caracterizadas, sin embargo el origen celular de estos tumores todavía se desconoce. Los glioblastomas, al igual que otros muchos tipos de tumores, están compuestos por una mezcla heterogénea de células transformadas y no transformadas. La hipótesis clásica postulaba que los glioblastomas seguían un modelo de evolución clonal, en el que las células gliales del cerebro adulto al ser las únicas células que podían dividirse, serían por tanto las únicas células susceptibles de sufrir una transformación. Se pensaba que los glioblastomas se originaban de una transformación neoplásica de la glía madura diferenciada, aunque este mecanismo no está totalmente demostrado (Nowell, 1976).

En la actualidad, sabemos que en el cerebro humano adulto existen otras poblaciones celulares con capacidad proliferativa ilimitada, como son las células madre o *stem cells*. Las células madre, debido a su estado indiferenciado y su capacidad de división asimétrica, son capaces de generar una célula hija exacta a sí misma (auto-renovación) y otra célula hija que se diferencia, dando lugar a poblaciones funcionalmente heterogéneas donde sólo unas pocas células son responsables del mantenimiento del nicho donde se encuentran estas células. Las poblaciones de células madre, en un cerebro adulto normal, se localizan en las paredes de los ventrículos laterales, zona subventricular (SVZ) (Sanai et al., 2004), en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Eriksson et al., 1998) y en la zona subcortical de la sustancia blanca (Nunes et al., 2003). Durante los últimos años, existen más datos que refuerzan la idea de que los glioblastomas podrían originarse a partir de células madre o progenitores neurales transformados debido a la activación de distintas rutas oncogénicas, o bien por la dediferenciación de los astrocitos, aunque esta segunda hipótesis se considera menos probable. Estas células madre transformadas mantienen la mayoría de las características y marcadores de superficie que las células madre normales y son las denominadas células madre del cáncer (*Cancer Stem Cells, CSC*) o “células

iniciadoras” del tumor. Actualmente se piensa que estas células serían las responsables del desarrollo y mantenimiento del glioblastoma (Singh et al., 2004b; Wen and Kesari, 2008) (Figura II) y podrían explicar la resistencia a las distintas terapias antitumorales convencionales así como la recurrencia del tumor (Reya et al., 2001). Por tanto, las terapias dirigidas contra las células madre del glioblastoma podrían eliminar estas células y, junto con las terapias utilizadas actualmente en la práctica clínica, dar lugar a una regresión estable del tumor (Wen and Kesari, 2008).

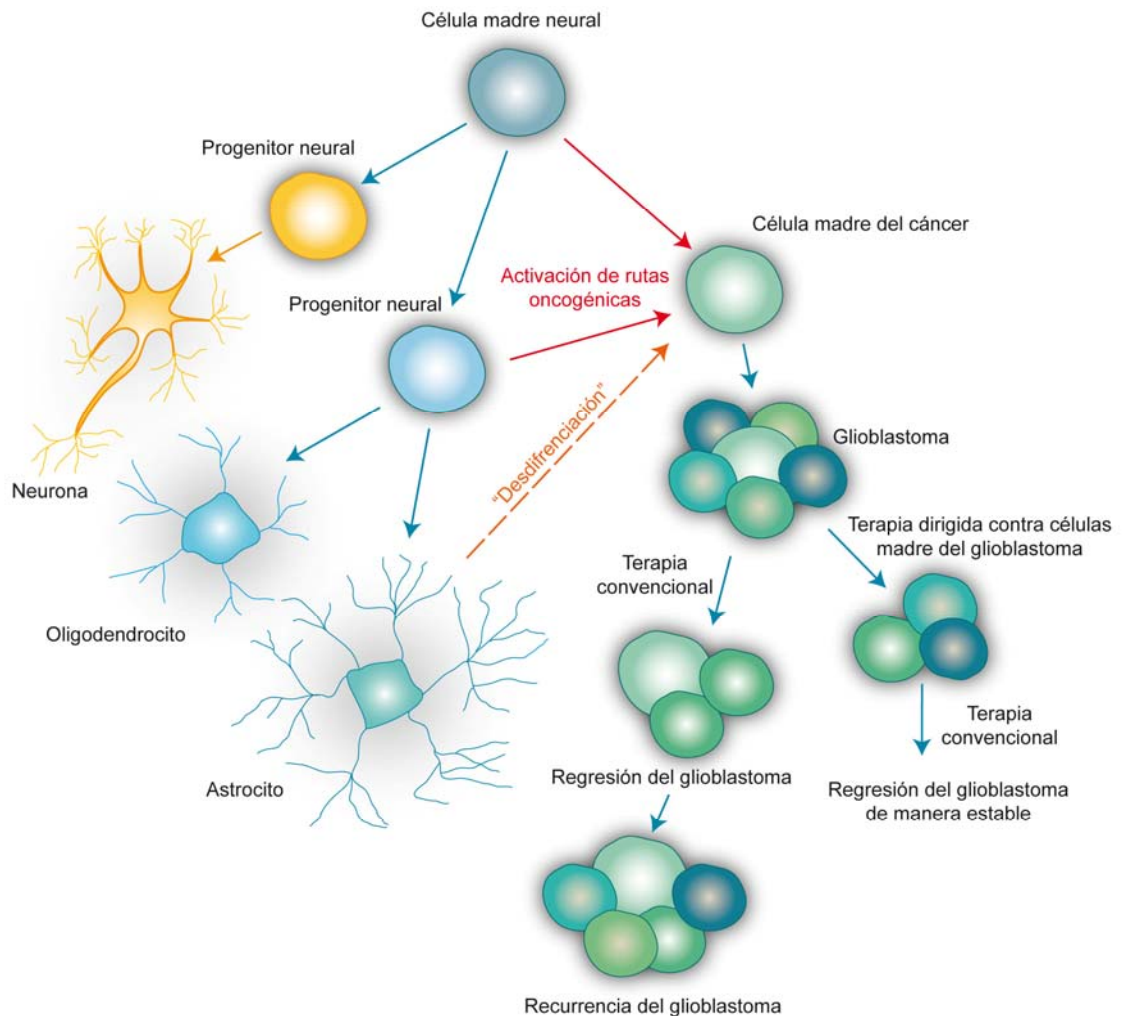


Figura II. Representación esquemática del posible papel de las células madre en el desarrollo del glioblastoma. Las células madre neurales tienen la capacidad de auto-renovación y multipotencialidad, dando lugar a los distintos linajes neurales. Se postula, que las células madre **del cáncer** presentes en glioblastomas procederían de células madre y progenitores neurales transformados o, menos frecuentemente, de la desdiferenciación de los astrocitos. Dada su resistencia a las terapias convencionales, como son la radio- y la quimioterapia, se piensa que participarían en el inicio y recurrencia de los glioblastomas.

Las células madre del cáncer, inicialmente identificadas en linfomas (Bonnet and Dick, 1997), también han sido descritas en una amplia variedad de tumores sólidos

incluyendo cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003), cáncer de pulmón (Kim et al., 2005), cáncer de páncreas (Li et al., 2007), cáncer de próstata (Collins et al., 2005), cáncer de colon (O'Brien et al., 2007) y tumores cerebrales (Singh et al., 2003). Estas células madre del cáncer presentan unos marcadores específicos dependiendo del tejido de origen, como $CD44^+/CD24^{-/bajo}$ en cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003) y $CD133^+$ en carcinoma de colon (O'Brien et al., 2007) y gliomas (Singh et al., 2004b).

Ambos modelos del origen tumoral, evolución clonal y evolución a partir de células madre del cáncer, no son excluyentes entre sí. En el caso de glioblastomas Singh y cols. demostraron mediante xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (NON-SCID) que una pequeña población de células $CD133^+$ aisladas de tumores cerebrales humanos era suficiente y necesaria para desarrollar tumores en el cerebro de estos ratones, con las mismas características histológicas que el tumor humano de origen. Observaron también que la inyección de células $CD133^-$ no daba origen a ningún tumor (Singh et al., 2004a). No obstante, estudios más recientes han demostrado que células $CD133^-$ procedentes de gliomas humanos también son capaces de formar nuevos tumores, por tanto es posible que haya células iniciadoras no $CD133^+$ (Beier et al., 2007; Wang et al., 2008). Esto puede deberse a que la separación física entre células que presentan o no dicho marcador es difícil y por tanto las células aisladas pueden contener ambas poblaciones (Rich and Eyler, 2008). En base a esto se han sugerido otros marcadores para la identificación de las células madre del glioblastoma como son: Nestina, Musashi-1, BMI-1 (polycomb ring finger oncogene) y Sox-2 (*SRY-box containing gene 2*) (Park and Rich, 2009). En la actualidad la utilización de marcadores para definir las células madre de GBMs, así como de otros tumores, es un tema de debate.

1.3 Terapias para el tratamiento del glioblastoma

Las terapias actualmente utilizadas para el tratamiento de glioblastomas varían dependiendo de si procede de un glioblastoma de diagnóstico reciente o un glioblastoma recurrente. Para los glioblastomas de nuevo diagnóstico, la terapia convencional es la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia. Debido a la naturaleza infiltrante del glioblastoma, la cirugía no es capaz de eliminar por completo el tumor, sin embargo la extracción de la mayor parte de masa tumoral permite reducir los síntomas.

La radioterapia posterior a la resección quirúrgica, incrementa el tiempo de supervivencia de los pacientes, por lo que se considera un tratamiento eficaz en la terapia

de los glioblastomas. La radioterapia convencional se combina con agentes quimioterapéuticos (Wen and Kesari, 2008) como son la Temozolomida (TMZ) y Carmustina, ambos agentes alquilantes son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Para los glioblastomas recurrentes, se realiza una segunda resección solamente en aquellos pacientes en que la masa tumoral esté siendo sintomática. La quimioterapia utilizada se basa en los agentes alquilantes anteriores y también en agentes antiangiogénicos como el bevacizumab (anticuerpo humanizado contra VEGF) o nuevas terapias experimentales en pacientes en fase terminal.

Como ya hemos comentado, en la actualidad hay datos que sugieren que las células madre del glioblastoma podrían ser las responsables de la recurrencia y mantenimiento del tumor, ya que presentan resistencia a la radioterapia y quimioterapia convencionales (Dirks, 2006; Liu et al., 2006) ([Figura II](#)). En los últimos años se está intentando desarrollar la denominada terapia combinada, que propone realizar terapia convencional junto con nuevas terapias dirigidas contra las células madre presentes en los glioblastomas. Sin embargo, la mayoría de estrategias descritas hasta el momento contra las células madre del cáncer podrían afectar no solo a las células madre del glioblastoma, sino también a las células madre neurales normales de los nichos neurogénicos del cerebro adulto con las consecuencias negativas que esto conllevaría, por tanto este campo está siendo objeto de una investigación muy activa (Palm and Schwamborn, 2010). En este sentido, el objetivo actualmente es conseguir erradicar las células madre responsables de la progresión y recurrencia de los GBMs sin dañar las células madre neurales no tumorales.

Desde nuestro punto de vista, creemos que es necesario conocer mejor las bases moleculares de estos tumores para así poder mejorar las estrategias terapéuticas y aumentar la supervivencia de los pacientes, en un corto plazo de tiempo. Los tratamientos disponibles actualmente para los glioblastomas son muy poco eficientes, por lo que la tasa de mortalidad sigue siendo muy alta. Por tanto, nuestro objetivo en este trabajo ha sido la identificación de nuevas dianas terapéuticas contra el glioblastoma multiforme, para el diseño de nuevos tratamientos más eficaces en este tipo de tumores, afectando no sólo a la mayor parte de las células tumorales sino también a las células madre del cáncer que no responden a las terapias convencionales.

2. CCAAT/Enhancer Binding Protein β

CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β), pertenece a una familia de factores de transcripción de tipo bZIP que se agrupan mayoritariamente en tres familias: las proteínas CREB/ATF (proteína de unión al elemento respuesta a AMP cíclico / factor de transcripción activador), las oncoproteínas de la familia Fos/Jun y la familia C/EBP. La familia C/EBP, a su vez, consta de seis miembros: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ , C/EBP ζ y tienen un importante papel en numerosos tejidos regulando procesos de proliferación y diferenciación celular, supervivencia y/o apoptosis, metabolismo, inflamación, transformación y tumorigénesis (Poli, 1998; Ramji and Foka, 2002, Zahnow, 2002).

La proteína C/EBP β fue clonada de manera independiente en distintos laboratorios recibiendo diferentes nombres según las circunstancias en que fue descrita: proteína de unión al DNA dependiente de interleuquina 6 (IL-6DBP) (Poli et al., 1990), factor nuclear implicado en la regulación génica de IL-6 (NF-IL6) (Akira et al., 1990), proteína activadora del hígado (LAP) (Descombes et al., 1990), proteína de unión a motivos C/EBP presentes en el promotor de la glicoproteína ácida α_1 (AGP/EBP) (Chang et al., 1990) y proteína relacionada con C/EBP (CRP2) (Williams et al., 1991). Actualmente el nombre más comúnmente utilizado es C/EBP β desde que Cao y cols propusieron la nomenclatura definitiva de las proteínas C/EBP (Cao et al., 1991).

2.1 Estructura e isoformas de C/EBP β

El factor de transcripción C/EBP β posee una estructura modular, al igual que muchos factores de transcripción, conteniendo varios dominios con diferente funcionalidad. En la zona carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión al DNA de tipo bZIP, el cual presenta un alto porcentaje de homología entre las distintas proteínas C/EBP. El dominio bZIP (Figura III) posee una estructura constituida por dos partes (Landschulz et al., 1989):

- Cremallera de leucinas: Región α -hélice en la cual se repite una leucina cada siete aminoácidos. Esta zona adopta una estructura en “coiled-coil” (O'Shea et al., 1989), la cual es la responsable de la homo o heterodimerización con otros miembros de la familia o con otras proteínas conteniendo motivos bZIP. Esta región es capaz también de interaccionar con otras proteínas que no presentan este motivo como el Factor Nuclear κ B (NF κ B) (Stein et al., 1993) o el receptor de glucocorticoides (Nishio et al., 1993)

- **Región básica:** Zona rica en aminoácidos básicos que es la responsable de su unión al DNA. Esta región se localiza en la zona carboxilo terminal inmediatamente adyacente a la cremallera de leucinas, siendo de gran importancia la distancia a la que se localiza de ésta, ya que cambios en el espaciamento entre ambos dominios conllevan la pérdida de unión al DNA (Pu and Struhl, 1991). Los aminoácidos presentes en esta región son los que confieren la especificidad de unión al DNA (Johnson, 1993). En el caso de C/EBP β , así como otros miembros de la familia, con la excepción de C/EBP ζ , la secuencia palindrómica de DNA que reconocen es: RTTGCGYAAY, donde R representa A ó G e Y representa C ó T (Osada et al., 1996).

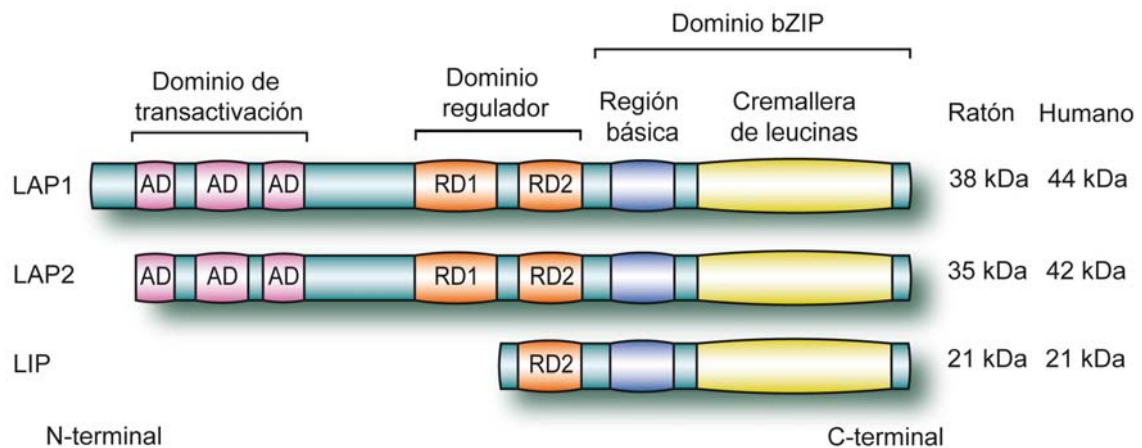


Figura III Representación esquemática de las diferentes isoformas de la proteína C/EBP β . Las distintas isoformas se generan por uso alternativo de distintos codones de iniciación. Se muestra la localización de los distintos dominios en cada una de las isoformas: **AD**: dominios de activación, dentro del dominio de transactivación. **RD**: dominios reguladores inhibitorios, dentro del dominio regulador **bZIP**: formado por la región básica y la cremallera de leucinas.

La zona amino terminal (Figura III) es la más divergente y en ella se localiza la región de transactivación en la que se encuentran 3 dominios de activación (AD1, AD2, AD3) y dos dominios de represión (RD1 y RD2). Los dominios de activación (AD) varían considerablemente de una proteína C/EBP a otra, sin embargo, dentro de ellos, existen tres motivos muy conservados entre varios miembros de la familia denominados ADM (Williams et al., 1995). Los dominios reguladores negativos (RD) pueden funcionar como atenuadores o como inhibidores de la transcripción. El dominio RD1 inhibe constitutivamente el dominio de transactivación haciendo que C/EBP β adopte una conformación que impide el acceso a los dominios AD, mientras que RD2 inhibe a

C/EBP β induciendo una conformación que interfiere en la capacidad de la región básica para interactuar con el DNA (Williams et al., 1995)

C/EBP β está codificado por un gen carente de intrones, pero del que se generan, por uso alternativo de distintos codones AUG de iniciación de un mismo mRNA, al menos, tres isoformas, que comparten la zona carboxilo terminal (Figura III): la isoforma completa LAP1 de 38 y 44 kDa (en ratón y humano, respectivamente), LAP2 de 35 y 42 kDa (ratón y humano, respectivamente) y la isoforma truncada LIP (proteína inhibidora de hígado) de 21 kDa, siendo LAP2 y LIP las isoformas mayoritarias (Descombes and Schibler, 1991). LIP no posee la zona amino terminal (AD1, AD2, AD3 y RD1) y por lo tanto carecería de actividad de transactivación, actuando como dominante negativo del resto de isoformas (Descombes and Schibler, 1991). Sin embargo, estudios recientes demuestran que LIP puede actuar como un activador transcripcional en determinados contextos celulares mediante la interacción con otros factores de transcripción no pertenecientes a la familia C/EBP, como son el receptor de glucocorticoides, el receptor de la progesterona B, NF- κ B, y Runx2 (*Runt-related transcription factor*) (rev. (Zahnow, 2009)).

2.2 Modificaciones postraduccionales de C/EBP β

Las modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación, acetilación, metilación y sumoilación de C/EBP β juegan un papel crucial en la regulación de su actividad transcripcional, en la interacción proteína-proteína y en la localización subcelular.

C/EBP β contiene múltiples sitios de fosforilación para diferentes quinasas que modulan tanto la localización subcelular (Metz and Ziff, 1991) como la capacidad de transactivación y de unión al DNA de este factor de transcripción (Kowenz-Leutz et al., 1994; Piwien-Pilipuk et al., 2002). Se ha descrito que las regiones reguladoras negativas (RD1 y RD2) mantendrían a la región de transactivación inhibida mediante un impedimento estérico dejando a la proteína en un estado inactivo hasta que recibiese la señal de activación adecuada, como una fosforilación o la interacción con otro factor, que cambiase su conformación y permitiese la activación de la transcripción mediada por esta proteína (Williams et al., 1995). Numerosos estudios han demostrado que la fosforilación de C/EBP β es el punto final de diversas rutas de señalización. Por ejemplo, la fosforilación selectiva de C/EBP β por la proteína quinasa A y C, modula la transactivación de sus genes diana en células de cáncer de colon y en células hepáticas (Chinery et al., 1997; Trautwein et al., 1994). Ras oncogénico estimula la capacidad de transactivación de C/EBP β (Zhu et

al., 2002) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK 3β) fosforilan a C/EBP β durante la diferenciación temprana de los adipocitos (Tang et al., 2005). También se ha demostrado que la hormona de crecimiento regula la fosforilación de C/EBP β a través de la activación de la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), de la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β) y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Piwien-Pilipuk et al., 2002; Piwien-Pilipuk et al., 2001).

2.3 Funciones de C/EBP β

C/EBP β regula multitud de procesos celulares en varios tejidos. C/EBP β se describió inicialmente como un factor de transcripción implicado en la vía de IL-6 (Akira et al., 1990). Más tarde, se vio que era importante en numerosos procesos celulares como la diferenciación de adipocitos, macrófagos y células mielocíticas, regulación de la expresión génica en hepatocitos, respuesta a fase aguda, inflamatoria e inmune y en la regeneración hepática entre otras funciones (revisión en (Ramji and Foka, 2002)).

C/EBP β es un factor esencial para la diferenciación y correcto funcionamiento de los macrófagos (Natsuka et al., 1992; Tanaka et al., 1995), e induce la expresión de diversos genes en respuesta a lipopolisacárido (LPS) (Wadleigh et al., 2000). La delección de C/EBP β en ratón causa defectos en la actividad tumoricida y bactericida de los macrófagos, en la respuesta inmune de los “T helper 1”, en la fertilidad femenina, y en el desarrollo y diferenciación de células mieloides y adipocitos (Screpanti et al., 1995; Sterneck et al., 1997; Tanaka et al., 1995). Además, los ratones knockout para C/EBP β no expresan fosfoenolpiruvato carboxikinasa ni movilizan glucógeno y aproximadamente un 40% mueren de hipoglucemia nada más nacer (Liu et al., 1999).

C/EBP β tiene un papel muy importante como regulador del balance entre proliferación y diferenciación en varios tipos celulares. Por una parte, se ha observado que C/EBP β regula la proliferación y regeneración hepática (Greenbaum et al., 1998) y por otro lado, C/EBP β regula a nivel genético la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos (revisión en (Rosen et al., 2000)). Asimismo, Seagroves y cols. han demostrado que C/EBP β se requiere para la morfogénesis ductal, el desarrollo lobuloadveolar, y la diferenciación funcional de las células del epitelio mamario (Seagroves et al., 1998). Nuestro grupo ha demostrado también que la sobreexpresión de C/EBP β induce diferenciación neuronal y que esta inducción requiere la activación de la vía PI3K (Cortes-

Canteli et al., 2002). En conjunto, estos datos sugieren que C/EBP β juega un importante papel en la especificación del tipo celular.

C/EBP β se expresa también ampliamente en el cerebro adulto y neonatal (Nadeau et al., 2005), siendo la proteína C/EBP mayoritaria en el hipocampo (Yukawa et al., 1998). Niveles elevados de esta proteína se han observado en astrocitos corticales de ratón (Yano et al., 1996). Varios estudios, entre los que se incluyen datos de nuestro laboratorio, sugieren que esta proteína podría tener funciones importantes en el cerebro. La primera evidencia de que C/EBP β tenía un papel importante en cerebro proviene de los trabajos de Eric Kandel demostrando un papel fundamental de esta proteína, en la consolidación de la memoria a largo plazo (Alberini et al., 1994). Posteriormente otros trabajos han demostrado el papel de C/EBP β en este proceso en mamíferos, junto con p-CREB (Yukawa et al., 1998). También, Menard *y col* definieron la ruta MEK-C/EBP como esencial para que los progenitores corticales se convirtieran en neuronas postmitóticas (Menard et al., 2002) y, más recientemente, Fuentealba *y col* han mostrado que esta proteína es fundamental en la proliferación de las células de Schwann (Fuentealba et al., 2004). Como acabamos de comentar, nuestro grupo ha demostrado que C/EBP β es un factor importante en la diferenciación neuronal (Cortes-Canteli et al., 2002). Además, mediante análisis de microarrays con células que sobreexpresan C/EBP β , hemos encontrado que esta proteína induce la expresión de diversos genes implicados en procesos inflamatorios y de daño neural (Cortes-Canteli et al., 2004) y, más recientemente hemos demostrado que ratones deficientes para C/EBP β muestran una reacción inflamatoria reducida en respuesta a un daño excitotóxico y una menor muerte neuronal en hipocampo (Cortes-Canteli et al., 2008).

2.4 Papel de C/EBP β en el desarrollo de tumores

Los efectos de C/EBP β en el desarrollo tumoral es un tema controvertido; hay datos que sugieren que C/EBP β actuaría como un potente promotor del crecimiento celular, mientras que otros indican que desempeña un papel antiproliferativo. Por ejemplo, la sobreexpresión de LAP2 induce parada del ciclo celular en la transición G1-S en células de hepatocarcinoma (HepG2) (Buck et al., 1994) y en queratinocitos (Zhu et al., 1999). De modo similar, la expresión ectópica de C/EBP β en fibroblastos primarios provoca parada de ciclo celular y es necesaria para la senescencia inducida por Ras^{V12} (Sebastian et al., 2005). Por el contrario, se ha observado que C/EBP β es abundante en tumores

colorrectales (Rask et al., 2000) y que en cáncer de ovario su expresión se asocia a la progresión tumoral (Sundfeldt et al., 1999). Datos recientes muestran que C/EBP β además de estar asociado a la progresión tumoral en células de cáncer de próstata es capaz de regular la expresión de genes metastáticos en este tipo de tumores (Kim and Fields, 2008; Kim et al., 2009). También se ha demostrado que la sobreexpresión de C/EBP β en células mamarias epiteliales humanas (MCF10A) induce proliferación y un fenotipo parcialmente transformado e invasivo (Bundy and Sealy, 2003) junto con una disrupción en la arquitectura epitelial de estas células (Bundy et al., 2005). Además, datos recientes demuestran que en células MCF10A transformadas, C/EBP β se encuentra sobreexpresada y regula la expresión del gen anti-apoptótico bcl-xl (Connors et al., 2009). Por otro lado, la supresión del gen C/EBP β confiere a los ratones resistencia al desarrollo de cáncer de piel inducido por diversos carcinógenos (Zhu et al., 2002). La expresión de C/EBP β también ha sido asociada con tumores dependientes de ciclina D1 (Lamb et al., 2003).

En relación con los tumores cerebrales, datos recientes indican que la expresión de C/EBP β está aumentada en gliomas de alto grado en comparación con gliomas menos agresivos, y pacientes en los que la expresión tumoral de C/EBP β es menor tienen una mayor supervivencia (Homma et al., 2006).

3. Proteína de unión a calcio: S100A4

La proteína S100A4, también denominada metastasina o mts1, es un miembro de la superfamilia de proteínas de unión a calcio S100 y ha sido descrita como una proteína asociada con invasión tumoral y metástasis. Los primeros miembros de esta familia fueron descubiertos por Moore en 1965 en cerebro bovino y recibieron el nombre de S100 debido a que estas proteínas eran solubles en una solución de sulfato amónico al 100 % de saturación (Moore, 1965). La familia de proteínas S100 consta de al menos 25 miembros, en su mayoría tienen un bajo peso molecular (10-14 kDa) y solamente se encuentran en vertebrados. S100A4, al igual que otras proteínas de la familia S100, forma homodímeros simétricos estabilizados mediante interacciones no covalentes y cada monómero contiene dos motivos *EF-hand*: amino y carboxi-terminal (EF1 y EF2, respectivamente) de unión a calcio, necesarios para la dimerización de la proteína (Dukhanina et al., 1997). La unión a calcio conlleva un cambio conformacional en S100A4, que conduce a la formación de un bolsillo hidrofóbico necesario para el reconocimiento de sus proteínas diana (Malashkevich et al., 2008).

La proteína S100A4 presenta una localización intracelular, extracelular o ambas y no presenta actividad enzimática por sí misma, sino que sus principales funciones se ejercen mediante interacción con otras proteínas. Su localización intracelular se ha descrito que está implicada en: 1) proliferación y diferenciación celular vía p53, 2) interacción con distintos componentes del citoesqueleto como la miosina, implicados en la motilidad e invasión celular, 3) homeostasis del calcio mediante su interacción con CCN3 capaz de regular su flujo, 4) interacción con la ruta Wnt/ β -catenina para la regulación de la actividad enzimática de metaloproteasas (MMP) e inhibidores de éstas (TIMP), asociados a la remodelación de la matriz extracelular (ECM) y 5) inducción de angiogénesis (rev. (Sherbet, 2009)).

Se ha observado una relación entre expresión de S100A4 y metástasis en diferentes modelos animales y estos datos sugieren que S100A4 podría ser un marcador de mal pronóstico en diferentes cánceres humanos metastáticos incluyendo cáncer de mama (Rudland et al., 2000), colorrectal (Gongoll et al., 2002), vejiga (Davies et al., 2002), carcinoma escamoso de esófago (Ninomiya et al., 2001), meduloblastoma (Hernan et al., 2003), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Kimura et al., 2000), gástrico (Cho et al., 2003), páncreas (Rosty et al., 2002), próstata (Saleem et al., 2005) y tiroides (Zou et al., 2005). Se ha observado también que S100A4 puede ser secretada al espacio extracelular por células tumorales o por células del estroma, afectando a procesos relacionados con la progresión tumoral tales como la angiogénesis por estimulación de la motilidad de las células endoteliales (Ambartsumian et al., 2001), y la activación de metaloproteasas (Schmidt-Hansen et al., 2004b). En relación con esto se ha demostrado que fibroblastos en cultivo secretan S100A4 constitutivamente, sin embargo si se co-cultivan con células tumorales la liberación de S100A4 por parte de los fibroblastos aumenta (Schmidt-Hansen et al., 2004a).

Con respecto al sistema nervioso central, S100A4 se expresa específicamente en astrocitos de la sustancia blanca y dicha expresión se ve aumentada tras un daño cerebral (Kozlova and Lukanidin, 2002). Sin embargo, su función en cerebro sigue siendo desconocida, aunque ha sido relacionada con el desarrollo del hipocampo y de la corteza temporal en humanos (Chan et al., 2003). Datos recientes demuestran que la expresión de S100A4 en tumores del sistema nervioso central está relacionada con el grado de malignidad del tumor, presentando una mayor expresión de S100A4 los gliomas de alto grado que los de bajo grado (Harris et al., 2008; Takenaga et al., 2007).

4. Glucógeno Sintasa Quinasa 3

La proteína glucógeno sintasa quinasa 3 fue inicialmente identificada como un regulador clave en el metabolismo de la glucosa, fosforilando e inhibiendo a la glucógeno sintasa (GS) (Embi et al., 1980), enzima implicada en la biosíntesis del glucógeno. El análisis de los sitios de fosforilación en GS reveló que se trataba de una proteína distinta de la proteína quinasa A (PKA) y de la fosforilasa quinasa, que eran las dos enzimas con actividad glucógeno sintasa quinasa descritas hasta el momento. Por este motivo se denominó glucógeno sintasa quinasa-3.

GSK-3 es una serina/treonina quinasa multifuncional, ya que ha sido relacionada con diversos procesos celulares entre los que se encuentran proliferación y supervivencia, metabolismo, estructura celular, inflamación, tumorigénesis, diabetes y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, donde GSK-3 daría lugar a la aparición de los ovillos neurofibrilares característicos de esta enfermedad por hiperfosforilación de la proteína *tau* (rev. (Cohen and Frame, 2001; Jope and Johnson, 2004; Jope et al., 2007)). Se ha descrito que GSK3 juega un papel clave en dos de las principales rutas de señalización celular como son la ruta de PI3K regulada por insulina y factores de crecimiento y la ruta de Wnt (*Wingless-Int*) necesaria para el desarrollo embrionario e implicada en procesos tumorales (rev. (Cohen and Frame, 2001)).

4.1 Estructura de GSK-3

La caracterización y clonaje de esta serina/treonina quinasa reveló dos isoformas en mamíferos: GSK-3 α de 51 kDa y GSK-3 β de 47 kDa, ambas codificadas por distintos genes pero presentando un 98 % de homología en el dominio quinasa (Woodgett, 1990). Las regiones con menor homología corresponden al extremo C-terminal, con tan solo un 36 % y el extremo N-terminal en el que solo la isoforma GSK-3 α presenta una región rica en glicinas (Woodgett, 1990) (Figura IV).

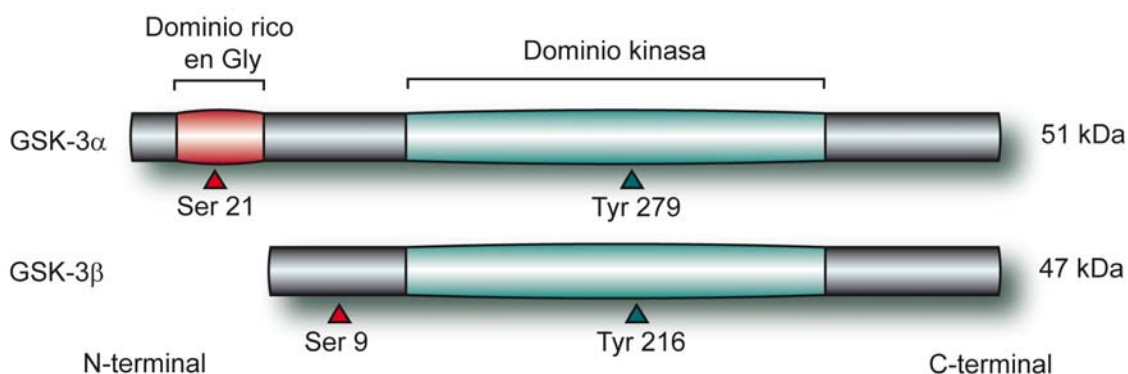


Figura IV. Representación esquemática de las diferentes isoformas de la proteína GSK-3, α y β . Ambas isoformas están codificadas por distintos genes y presentan un dominio quinasa con una homología de secuencia del 98%. Sin embargo la isoforma GSK-3 α presenta en su extremo N-terminal un dominio rico en glicinas del que carece la isoforma GSK-3 β . Se muestra la localización de los sitios de fosforilación activadores (tirosina 279 y 216) e inhibidores (serina 21 y 9) de GSK-3.

Ambas isoformas son ubicuas, existiendo una mayor expresión de GSK-3 β en cerebro. En humanos y roedores mediante corte y empalme alternativo de su mRNA, GSK3 β da lugar a dos variantes: GSK3 β 1 y GSK3 β 2, siendo ambas más abundantes que GSK-3 α en el sistema nervioso central (Mukai et al., 2002).

A pesar del alto grado de homología, ambas isoformas son funcionalmente distintas. Los ratones deficientes en GSK-3 β son viables sólo hasta el día embrionario E13,5, debido a una degeneración severa del hígado, lo que sugiere que, GSK-3 α es capaz de suplir la ausencia de GSK-3 β hasta ese momento, pero no después (Hoeflich, 2000). Sin embargo, ratones deficientes en GSK-3 α si fueron viables (MacAulay et al., 2007).

No se conoce una secuencia específica para el reconocimiento de los sustratos por parte de GSK-3, pero muchos de ellos necesitan ser previamente fosforilados (*priming*) por una quinasa distinta y en una serina o treonina separada cuatro aminoácidos del sitio de fosforilación de GSK-3. El motivo consenso está definido por Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr(P), siendo la primera serina/treonina el residuo de interés, X cualquier aminoácido y la segunda serina o treonina el residuo prefosforilado, el cual es un sitio indispensable para el reconocimiento por GSK-3. La necesidad de una fosforilación previa del sustrato viene dada porque el residuo prefosforilado del sustrato se une al bolsillo cargado positivamente de GSK-3 β (formado por los residuos arginina 96, arginina 180 y lisina 205) y permite una correcta orientación tanto del dominio de unión a ATP (*ATP binding site*, comprende los residuos 132-141) como del sustrato, para su fosforilación (rev. (Doble and Woodgett, 2003; Grimes and Jope, 2001; Phukan et al., 2010))

4.2 Regulación de GSK-3 β

Al contrario que la mayoría de las proteínas quinasas, la enzima GSK-3 β se encuentra constitutivamente activa en células no estimuladas. Se conocen más de 40 proteínas que son fosforiladas por ella, por tanto su actividad debe estar estrictamente regulada por distintos mecanismos en función de cada sustrato que vaya a ser fosforilado. Se han descrito diversos mecanismos de regulación de esta enzima, entre ellos, fosforilación, localización subcelular e interacción con otras proteínas, siendo la fosforilación el mecanismo más estudiado.

4.2.1 Fosforilación en serina 9

La fosforilación de GSK-3 β en serina 9 (Ser 9) tiene como resultado una reducción significativa de su actividad, haciendo que la proteína quede en un estado inactivo. La Ser 9 fosforilada se une al bolsillo cargado positivamente donde se uniría el sustrato prefosforilado y hace que el extremo N-terminal cambie de conformación formando un pseudosustrato que bloquearía el dominio catalítico impidiendo así la unión de sustratos a la proteína. (rev. (Cohen and Frame, 2001; Doble and Woodgett, 2003)) (Figura V).

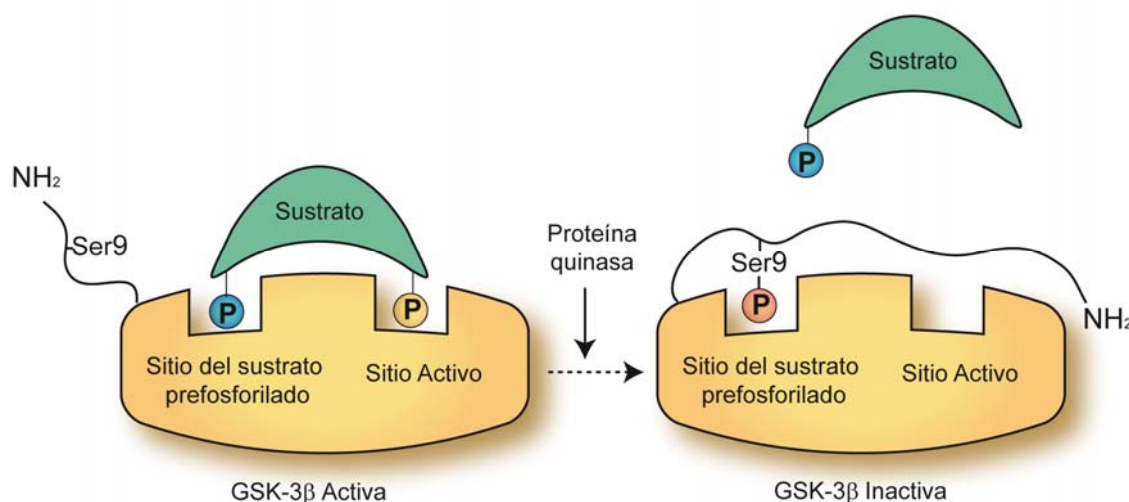


Figura V. Representación esquemática de la inhibición de GSK-3 β por fosforilación en serina 9. La serina 9 fosforilada actúa como un pseudosustrato impidiendo la unión de GSK-3 β a su sustrato prefosforilado.

La fosforilación de la serina 9 puede ser llevada a cabo por distintas quinasas como (1) las quinasas reguladas por mitógeno (ERK/MAPK), en respuesta a factores de crecimiento como EGF/PDGF, vía p90RSK, (2) la quinasa p70S6K (3), proteína quinasa A

(PKA), (4) AKT, también llamada proteína quinasa B (PKB), y (5) diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) (rev. (Doble and Woodgett, 2003; Luo, 2009)).

4.2.2 Fosforilación en tirosina 216

La fosforilación de GSK-3 β en tirosina 216 (Tyr 216), por el contrario, conlleva un aumento de actividad ya que parece ser que este residuo juega un importante papel en favorecer la apertura del sitio de unión al sustrato. Esta fosforilación no parece ser imprescindible para su actividad, ya que la forma no fosforilada no presenta impedimentos en la apertura del sitio de unión al sustrato (Dajani et al., 2001). Existe cierta controversia sobre el origen de esta modificación. Se ha sugerido que podría deberse a una autofosforilación intramolecular dependiente de la chaperona Hsp90 (Lochhead et al., 2006). También se ha postulado que la fosforilación es llevada a cabo por diversas tirosinas quinasas como PYK2 (tirosina quinasa rica en prolinas 2) y Fyn, un miembro de la familia Src tirosina quinasa que se expresa en cerebro y linfocitos T (Hartigan et al., 2001; Lesort et al., 1999). Estas tirosinas quinasas se activarían por alteraciones en los niveles del calcio intracelular (Hartigan and Johnson, 1999). Se ha descrito que también puede ser fosforilada por MEK1/2 (proteína quinasa-quinasa activada por mitógeno 1 y 2) (Takahashi-Yanaga et al., 2004) debido a su analogía con los miembros de la familia MAPK (rev. (Cohen and Frame, 2001)).

4.3 Papel de GSK3 β en el desarrollo de tumores

Existe una gran controversia sobre si GSK-3 β es un “supresor” o un “promotor tumoral”. En determinados tipos de cáncer de piel, tanto en modelos de ratón como en tejido humano, así como en cáncer de mama y de pulmón, GSK-3 β actúa como un supresor tumoral actuando como un regulador negativo fosforilando a la oncoproteína β -catenina e impidiendo su translocación al núcleo y por tanto la activación de sus genes diana. Farago y cols. (Farago et al., 2005) han mostrado que la expresión de una forma inactiva de GSK-3 β en glándula mamaria promovería el desarrollo del cáncer de mama.

Sin embargo, en otros tipos de tumores como en el cáncer de colon, páncreas, ovario e hígado actúa como un promotor tumoral, encontrándose su actividad aumentada en este tipo de tumores y donde una inhibición de esta proteína da lugar a una recurrencia en el tumor (revisión en (Luo, 2009)). En cáncer de ovario por ejemplo, donde los niveles de

GSK-3 β son muy elevados, Cao y cols. mostraron que una inhibición de la actividad de esta enzima mediante distintos inhibidores farmacológicos daba lugar a la supresión de la proliferación de las células de ovario tumorales (Cao et al., 2006). Lo mismo ocurre en cáncer de colon, donde la inhibición farmacológica o por RNA de interferencia de GSK-3 β produce una reducción en la actividad de esta enzima que conlleva una disminución de la supervivencia y proliferación *in vitro* e *in vivo* de las células de colon tumorales (Shakoori et al., 2007; Shakoori et al., 2005).

Los estudios que relacionan a la enzima GSK-3 β con el desarrollo de glioblastomas son muy pocos y relativamente recientes. Estos trabajos indican que GSK-3 β se comportaría como un promotor tumoral en este tipo de tumores. Kotliarova y cols., (Kotliarova et al., 2008), observaron que la inhibición de GSK-3 β mediante inhibidores farmacológicos y RNA de interferencia, tenía como consecuencia un incremento en la muerte de células de glioblastoma humano. Estos autores muestran que la inhibición de GSK-3 β activa c-myc lo cual conduce a la inducción de agentes proapoptóticos como Bax, Bim y TRAIL y por tanto a una pérdida de viabilidad celular. Además de este aumento en apoptosis a través de un mecanismo mediado por c-myc, la inhibición de GSK-3 β también provoca una significativa disminución en la actividad de NF- κ B la cual se ha demostrado que induce un aumento en apoptosis en diferentes líneas celulares (Deng et al., 2004; Takada et al., 2004)

Trabajos posteriores, utilizando diversos inhibidores de GSK3 β y RNA interferentes para esta proteína, también sugieren que la inhibición de GSK-3 β tiene un efecto supresor tumoral en células de glioblastoma (Korur et al., 2009; Li et al., 2010; Miyashita et al., 2009)

4.4 Inhibidores de GSK-3 β y su relevancia terapéutica

Los inhibidores de GSK-3 β se han identificado como buenas estrategias terapéuticas en el tratamiento de distintas patologías como enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo 2, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares o, más recientemente, en cáncer (Phukan et al., 2010).

El primer inhibidor descrito de GSK-3 β es el litio, el cual es utilizado fundamentalmente para el tratamiento del trastorno bipolar. Se ha descrito como un inhibidor directo, compitiendo con GSK-3 β por el magnesio o indirecto, manteniendo el

estado de fosforilación en Ser 9, sin embargo no es selectivo ya que se ha observado que puede inhibir a muchas otras enzimas (O'Brien and Klein, 2009). Existen también diferentes inhibidores comerciales, con mayor o menor grado de especificidad, la mayoría de los cuales provocan la inhibición de esta enzima por su unión directa a ella.

Debido al importante papel de GSK-3 β en numerosos procesos celulares y los efectos beneficiosos de sus inhibidores en diversas patologías, esta enzima se ha convertido en una importante diana para el desarrollo de nuevas drogas inhibidoras que puedan por tanto convertirse en potenciales nuevos fármacos terapéuticos. Entre los nuevos inhibidores sintetizados, se encuentran la familia de las tiadiazolidinonas (TDZDs), desarrolladas como inhibidores ATP no competitivos de GSK-3 β con un alto grado de especificidad, y que no parecen afectar a otras quinasas (Martinez et al., 2002) (Figura VI). Estos inhibidores interaccionan con GSK-3 β uniéndose al sitio del sustrato prefosforilado mediante la interacción con arginina 96 (R 96), lisina 205 (K 205) y tirosina 216 (Y 216), citada anteriormente como responsable del aumento de activación de la enzima (Figura VI).

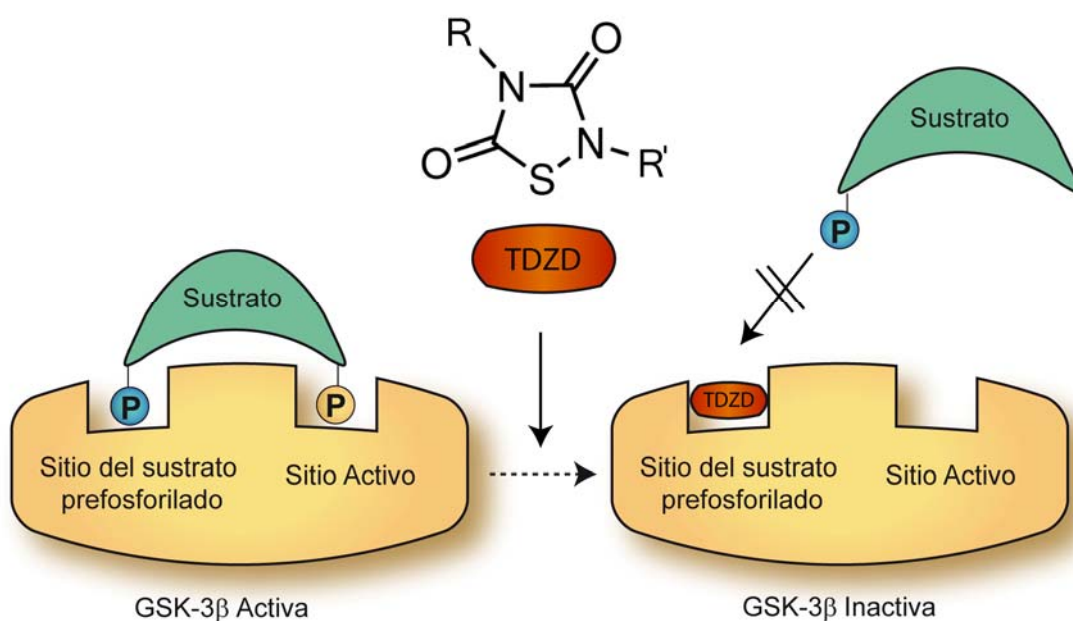
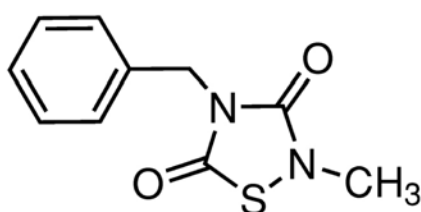


Figura VI. Las tiadiazolidinonas, TDZDs, como inhibidores ATP no competitivos de la enzima GSK-3 β . Se muestra la fórmula de las TDZDs y la representación esquemática de su mecanismo de acción. Las TDZDs interaccionan con GSK-3 β directamente uniéndose al sitio del sustrato prefosforilado, impidiendo por tanto que éste se una y dejando a la enzima inactiva.

Además del efecto de TDZDs sobre inhibición de GSK-3 β nuestro grupo ha demostrado recientemente que diferentes miembros de la familia TDZDs pueden también actuar, no solo a través de la inactivación de esta enzima, sino también por otros mecanismos entre los cuales estaría la activación del receptor nuclear PPAR γ , (Luna-Medina et al., 2005; Luna-Medina et al., 2007). En este sentido se sabe que diferentes ligandos de este receptor tienen un papel muy importante en la regulación de la proliferación y muerte celular en diferentes tipos de tumores, incluyendo glioblastomas (Grommes, 2006 #1894) (Grommes et al., 2006).

En relación a su posible papel terapéutico en procesos tumorales, se ha demostrado que las TDZDs son capaces de causar la muerte de distintos tipos de células tumorales como células de cáncer de colon (Ghosh and Altieri, 2005) y de mieloma múltiple (Zhou et al., 2008). También se ha descrito que el compuesto TDZD-8 (Figura VII) induce apoptosis en células madre de leucemia (Guzman et al., 2007) y reduce el desarrollo del tumor en cáncer de próstata (Sun et al., 2007; Zhu et al., 2010).



TDZD-8

Figura VII. Tiadiazolidinona TDZD-8. El compuesto TDZD-8 se ha descrito como un inhibidor ATP no competitivo de la enzima GSK-3 β . Se ha descrito su función como antitumoral en diversos tipos de cáncer.

Objetivos

1. Análisis del papel del factor de transcripción C/EBP β en el desarrollo de glioblastomas *in vitro* e *in vivo*.
2. Identificación de nuevas dianas transcripcionales de C/EBP β en células de glioblastoma de ratón.
3. Análisis del efecto de la inhibición de la enzima GSK-3 β sobre el desarrollo de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluación de los efectos de C/EBP β y de la inhibición de GSK-3 β sobre la capacidad de formación y auto-renovación de las células madre de glioblastoma *in vitro*.

Materiales y Métodos

1. Cultivos celulares

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares de glioblastoma humano: LN18, A172 y U373 y de glioblastoma de ratón: GL261.

La línea celular de glioblastoma humano, LN18, fue cedida por el Dr. Héctor Peinado, (*Cornell University*, Nueva York, Estados Unidos) y las líneas A172 y U373 fueron cedidas por el Dr. Manuel Guzmán (Universidad Complutense de Madrid). Dichas líneas fueron mantenidas en medio RPMI (Instituto Memorial *Roswell Park*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM glutamina, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. La línea celular de glioblastoma de ratón, GL261, se obtuvo del banco de tumores *NCI-Frederick Cancer Research Tumor Repository* (Frederick, MD). La línea se propagó en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM glutamina, 2,5 µg/ml fungizona y 40 µg/ml gentamicina. Todas las células fueron mantenidas a 37° C de temperatura, 95 % de humedad y 5 % de presión de CO₂. Los tratamientos de las células con el compuesto TDZD-8 (Sigma) se realizaron según se indica en el apartado de “Resultados”

La obtención de células madre de glioblastoma y el subsecuente cultivo de éstas como neuroesferas (NSFG) se realizó a partir de células GL261 sembrando y creciendo dichas células en medio normal (RPMI, 10 % suero fetal bovino, glutamina, gentamicina y fungizona) y recogiendo el sobrenadante dos días después de haber sido descongeladas. Este sobrenadante se centrifugó y se resuspendió en medio sin suero: Ham's F-12/DMEM (medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco) en proporción 1:1, suplementado con B27 1x (Invitrogen), 2 mM glutamina, 40 µg/ml gentamicina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Preprotech) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, Preprotech). En estas condiciones, normalmente después de una semana, se forman las NSFG primarias. Pasado este tiempo, las NSFG fueron disgregadas y sembradas a una densidad de 50.000 células/ml, en placas de 6 pocillos, en las mismas condiciones que las primarias, durante 7 y 14 días, formándose las denominadas NSFG secundarias. Para los experimentos de auto-renovación (*Self-renewing*), las NSFG fueron disgregadas y sembradas en placas de 12 pocillos, a una densidad de 2.000 células/ml, en presencia de factores de crecimiento durante 7 y 14 días para determinar la capacidad de formación de NSFG secundarias. Los cultivos de neuroesferas se trataron con TDZD-8 tal y como se describe en la sección de Resultados.

2. Generación de líneas celulares estables: Transfección estable e infección lentiviral

• Transfección estable

Para disminuir la expresión de C/EBP β en ratón, se utilizaron dos RNAs de interferencia (RNAi) distintos y un RNA de interferencia control, cuya secuencia no presenta homología con ningún gen conocido de mamíferos (*non silencing*). Las secuencias de interferencia para C/EBP β fueron obtenidas de Dharmacon (Thermo Scientific): 5'-GAGCGACGAGTACAAGATG- 3' y 5'-CCTTTAGACCCATGGAAGTTT- 3'. Estas secuencias se utilizaron para generar las líneas I4 e I5, respectivamente. A partir de los RNAs de interferencia, se diseñaron los oligonucleótidos que forman las horquillas cortas de RNA (*short hairpin RNA*, *shRNA*), que contienen 55 pares de bases y que se encuentran flanqueados por las enzimas de restricción *Bam HI* y *Hind III*. Los shRNAs fueron anillados y clonados en el vector pSilencer 4.1-CMV (Ambion), en donde el shRNA se encuentra bajo el control del promotor CMV. Las células GL261 fueron transfectadas de manera independiente con 5 μ g de los plásmidos anteriores utilizando *lipofectamine 2000* (Invitrogen), como se indica en el protocolo de la casa comercial, y seleccionadas a las 48 horas con 400 μ g/ml de G418 (Promega) en el medio de cultivo. Se obtuvieron las líneas C1 y C2 (expresan un RNA de interferencia control) y las líneas I4 e I5 (expresan RNAs de interferencia específicos para C/EBP β de ratón). La formación de neuroesferas del glioblastoma (NSFG) primarias, secundarias y experimentos de auto-renovación, de las poblaciones PC1 y PI4 obtenidas a partir de C1 e I4 (línea control e interferida en C/EBP β , respectivamente) se realizaron como se describe en el apartado anterior. La cuantificación de las NSFG se llevo a cabo contando el número de NSFG presentes en 12 campos, elegidos de manera aleatoria, de 3 pocillos distintos de cada placa.

• Infección lentiviral

La expresión de la proteína humana C/EBP β fue disminuida mediante un shRNA que se encuentra bajo el control del promotor H1 en el vector lentiviral pFUGW. La secuencia de interferencia seleccionada fue: 5'- GAAGACCGTGGACAAGCAC -3' y la secuencia control (no presenta homología con ningún gen conocido de mamíferos): 5'-GCCGCTTTGTAGGATAGAG -3', ambos plásmidos lentivirales fueron cedidos por la Dra. Quintanilla-Martinez (Universitätsklinikum Tübingen, Alemania) (Anastasov et al., 2010; Anastasov et al., 2009). Para la infección lentiviral de la línea LN18, las células HEK293T, que son células epiteliales de ratón, fueron transfectadas de manera

independiente con *lipofectamine 2000* en placas de 100 mm con los vectores lentivirales anteriores (5µg de cada uno) y con los vectores lentivirales de tercera generación específicos (Tabla I): 1,75µg de pMD2-G, 3,25µg de pMDLg/pRRE, y 1,25µg de pRSV-Rev, necesarios para la formación de las partículas lentivirales. El sobrenadante de las células HEK293T, conteniendo los virus, fue recogido a las 48 horas de la transfección, filtrado mediante un filtro de 0,45 µm y se le añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. Después, dicho sobrenadante fue añadido a las células a infectar. Este proceso se repitió a las 12 horas con una concentración final de polibreno de 4 µg/ml y a las 24 horas con una concentración final de polibreno de 8 µg/ml. A continuación las células fueron seleccionadas con 3 µg/ml de puomicina, obteniéndose las líneas FS (expresa un RNA de interferencia sin homología conocida) y FC1 (expresa un RNA de interferencia específico para C/EBPβ de humano)

Vectores lentivirales	Expresión	Origen
pMD2-G	env	(Dull et al., 1998)
pMDLg/pRRE	gag-pol	(Dull et al., 1998)
pRSV-Rev	Rev	(Dull et al., 1998)

Tabla I. Vectores lentivirales de tercera generación utilizados para la infección

3. Clonaje del promotor del gen S100A4 de ratón en el plásmido pGL4.10

Para estudiar la regulación de dicho promotor por C/EBPβ, se amplificaron mediante cebadores específicos (Tabla II) tanto el promotor completo como el promotor sin el sitio de unión de C/EBPβ, ambos fragmentos se subclonaron en el plásmido linearizado pCRII (permite una ligación directa del producto de PCR en el plásmido), mediante el kit *Dual Promoter TA Cloning* (Invitrogen), y se transformaron en bacterias *E.coli*. Las colonias de los plásmidos recombinantes que contienen los productos de PCR se analizaron por digestión con EcoRI y aquellos clones que fueron positivos para la digestión se secuenciaron con los oligonucleótidos universales T7 y T3 como cebadores directo y reverso, respectivamente. Aquellas secuencias sin mutaciones ni deleciones fueron clonadas entre los sitios *Kpn I* y *Xho I* del plásmido reportero pGL4.10 cedido por la Dra. Teresa Iglesias (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid) que contiene como gen

testigo el gen de la luciferasa, obteniéndose las construcciones pS100A4/1248 y pS100A4/298.

Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Región amplificada
GCTACCCATGAGCTTTTCGAG	CTACATCTGAGCTCCCGGAG	-1248/+267 (1515 pb)
CACACCTCATGTCCAGGTTG	CTACATCTGAGCTCCCGGAG	-298/+267 (565 pb)

Tabla II. Cebadores utilizados para el clonaje del promotor del gen S100A4 de ratón y su delección, en el plásmido pGL4.10

4. Mutagénesis dirigida

Se basa en generar mutaciones en una secuencia de DNA conocida y en una posición específica de dicha secuencia. Las mutaciones se realizaron en el promotor del gen S100A4 (secuencia -1248/+268, pS100A4/1248) específicamente en el sitio de unión del factor de transcripción C/EBP β (secuencia consenso localizada entre los nucleótidos -606/-591), mediante el kit de mutagénesis *QuickChange Site-Directed* (Stratagene). El sitio de unión fue determinado *in silico* mediante los programas informáticos *TF Search* y *Mat Inspector* (Genomatix). Se utilizaron los cebadores descritos en la [Tabla III](#) (se indica solamente el cebador directo) para realizar las mutaciones específicas en el sitio de unión, con las siguientes características recomendadas en el kit: contener entre 25 y 45 pares de bases con una temperatura de fusión (temperatura de *melting*, T_m) igual o mayor a 78° C, que la mutación se encuentre situada en el centro del cebador y que el contenido en CG debe ser de al menos un 40 %, además de utilizar dichos cebadores en exceso durante la reacción de PCR. Dicha reacción se llevo a cabo en las siguientes condiciones: un ciclo de 95° C durante 30 segundos, 18 ciclos de 95, 55 y 68° C, durante 30 segundos, un minuto y 4 minutos con 20 segundos, respectivamente. Una vez terminada la amplificación, la temperatura de la reacción se disminuyó a 4° C durante dos minutos y se digirió durante una hora a 37° C con la endonucleasa *Dpn I* capaz de eliminar el dsDNA parental (DNA de doble cadena) y dejar intacto el DNA obtenido de la amplificación con las mutaciones deseadas. Una vez secuenciado el DNA obtenido, aquellos plásmidos con las mutaciones correctas fueron transformados en *E.coli* y posteriormente utilizados para realizar transfecciones transitorias en GL261 (descrito anteriormente) y determinar la funcionalidad de dichas mutaciones en el promotor.

Nombre	Directo (5'-3')	Tm
Mut 1	---CGAATGCTCCTGTCA cc CCTCAATATCCTTAC-----	75,6° C
Mut 2	-----CCTGTCATTCTC cc TATCCTTACTCCAGC-----	73,5° C
Mut 3	---CGAATGCTCCTGTCA cc CCTC cc TATCCTTACTCCAGC-----	82,7° C
Mut 4a	---CGAATGCTCCTGTCA ggggggcc TATCCTTACTCCAGC-----	84,5° C
Mut 4b	---CGAATGCTCCTGTCA ggccccc TATCCTTACTCCAGC-----	84,5° C
Mut 4c	CCCGAATGCTCCTG agcggggggcgca CCTTACTCCAGCTT-----	91,7° C

Tabla III. Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida del promotor del gen S100A4. En minúscula se muestran las mutaciones realizadas. Tm: temperatura de *melting*.

5. Transfecciones transitorias

Los plásmidos reporteros que se han usado en este trabajo contienen el gen testigo luciferasa (Luc) bajo el control de los siguientes fragmentos de DNA:

1. Tres copias del elemento respuesta a NF- κ B en posición 5' al promotor mínimo del gen de la timidina quinasa (*tk*), 3 \times κB-tk-Luc, como se ha descrito previamente (Pignatelli et al., 2005)

2. Tres copias del elemento respuesta a PPAR γ en posición 5' al promotor mínimo del gen de la timidina quinasa (*tk*), pPPRE-tk-Luc, como se describe previamente (Luna-Medina et al., 2005).

3. El promotor del gen S100A4 de ratón (contiene la secuencia -1248/+267, pS100A4/1248) y el fragmento correspondiente a la delección del sitio de unión de C/EBP β (contiene la secuencia -298/+267, pS100A4/298), ambos clonados en el plásmido pGL4.10.

4. El promotor del gen S100A4 de ratón mutado en el sitio de unión de C/EBP β (secuencia consenso localizada entre los nucleótidos -606/-591, pS100A4/Mut4c), y clonado en el plásmido pGL4.10.

Como control interno de la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido reportero pCMV- β -gal (Clontech) que contiene el gen testigo β -galactosidasa (β -gal) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

El vector de expresión utilizado para el estudio de la regulación del promotor de S100A4 en ratón fue pcDNA3-C/EBP β , que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) y el cDNA del gen C/EBP β , clonado por la Dra. Marta Cortes-Canteli, (Cortes-Canteli et al., 2002). Para los ensayos de tranfección transitoria, las células GL261 se

transfectaron de manera independiente y por triplicado en placas de 24 pocillos con *lipofectamine 2000* con las construcciones mencionadas anteriormente. Se usaron 2 µg de 3xκB-tk-Luc, 1 µg de pS100A4/1248, 1 µg de pS100A4/298, 1µg de pS100A4/Mut 4c , 2 µg de pcDNA3-C/EBPβ y, como control de la eficiencia de transfección, 0,01 µg de pCMV-β-gal. La actividad luciferasa se midió utilizando el kit *luciferase assay system* (Promega) y la actividad β-galactosidasa con el reactivo *Beta-Glo Assay System* (Promega), en el luminómetro Glomax 96-*microplate Reader* (Promega). La actividad luciferasa se normalizó por la actividad β-galactosidasa (Luc/β-gal) y se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los triplicados. Todos los experimentos se repitieron, al menos, tres veces.

6. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los análisis de ChIP se realizaron básicamente como se describe en (Weinmann and Farnham, 2002) pero con algunas modificaciones. Las células GL261 fueron crecidas en placas de 100 mm y cuando llegaron a un 90 % de confluencia fueron fijadas con formaldehído al 1 % durante 15 minutos, en agitación suave. La fijación se detuvo con glicina 0,125 mM durante 5 minutos. Las células fueron lavadas con PBS 1x y levantadas utilizando un raspador, a continuación fueron pasadas a un tubo de 1,5 ml donde se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4° C. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron lisadas con tampón de lisis (0,5 % NP40, 85 mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8 e inhibidores de proteasas) y los núcleos fueron separados por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El resto nuclear se lisó con 300 µl de tampón de lisis nuclear (1 % SDS, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8 e inhibidores de proteasas), seguido de sonicación, para obtener fragmentos de cromatina entre 200 y 1000 pares de bases. Después de la sonicación se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Para obtener la cromatina total (Input) se separó el 10 % del sobrenadante y el resto se diluyó 1:10 con tampón de dilución para una posterior inmunoprecipitación (1,1 % Triton X-100, 0,01 % SDS, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA pH 8, 16,7 mM Tris-HCl pH 8 e inhibidores de proteasas). Se realizó un preaclorado con 25 µl de una matriz de Agarosa A/esperma de salmón (Upstate) que se centrifugó a 2.000 rpm, durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se incubó de manera independiente con los anticuerpos específicos anti-C/EBPβ (5 µg, Santa Cruz Biotech, origen: conejo) y anti-Ig G de conejo (2µg, Santa Cruz Biotech, α-Ig G) y sin anticuerpo (-Ac), estos dos últimos

como controles, durante toda la noche en rotación a 4° C, seguido de una incubación con 40 µl de la matriz Agarosa A/esperma de salmón, durante 2 horas en rotación a 4° C. Tras centrifugación y lavados con tampón suave (1% Triton X-100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl, pH 8 e inhibidores de proteasas), tampón fuerte (1% Triton X-100, 0,1 % SDS, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl, pH 8 e inhibidores de proteasas), tampón LiCl (0,25 M LiCl, 1 % NP40, 1 % deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1 e inhibidores de proteasas) y TE, se incubaron los inmunocomplejos con tampón de elución (1 % SDS, 100 mM NaHCO₃). La unión entre moléculas se revirtió calentando a 65° C durante al menos 4 horas, seguido del tratamiento con proteinasa K (80 µg/ml), RNAasa (80µg/ml), EDTA 20 mM y 80 mM Tris-HCl pH 6,5, a una temperatura de 42° C durante una hora. Tras una precipitación con fenol-cloroformo, la fracción de cromatina precipitada se usó para su amplificación por PCR (2 µl por reacción) utilizando los cebadores específicos que flanquean el sitio de unión del factor de transcripción C/EBPβ en el promotor del gen S100A4 de ratón y los cebadores específicos para el gen Gapdh. Los cebadores para la región promotora de S100A4 fueron: Directo (5'-3') TCCTGACTCCCCCTTTTACC y Reverso (5'-3') CTAAGTCCATCATGGCCTCC, amplificando la región -681/-522 (159 pares de bases) y para Gapdh: Directo (5'-3') GAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC y Reverso (5'-3') GCTGAACGGGAAGCTACATGGCATGG, amplificando la región +208/+712 (504 pares de bases)

7. Ensayos de proliferación, viabilidad y ciclo celular

• Incorporación de BrdU

Para determinar el efecto, de la disminución de C/EBPβ o del tratamiento con TDZD-8 sobre proliferación se realizaron dos tipos de ensayos basados en la incorporación de Brdu (Bromodesoxiuridina): 1. Colorimétrico y 2. Contaje de células positivas para BrdU, en estudios de inmunofluorescencia.

1. Colorimétrico: se utilizó el kit *Cell proliferation ELISA-BrdU colorimetric* (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo; a las 24 horas se añadió al medio de BrdU (10 µM), y las células fueron cultivadas 16 horas más, hasta su fijación y procesamiento. La incorporación de BrdU al DNA fue determinada en el lector de placas ELISA, midiendo la absorbancia a 370 y 492

nm. La concentración de TDZD-8 usada fue de 20 μ M en el caso de las células GL261, A172 y U373.

2. Inmunofluorescencia: las líneas C1 e I4 fueron crecidas sobre cristales en placas de 24 pocillos, 24 horas después se añadió de BrdU (10 μ M) al medio de incubación, y las células fueron cultivadas 16 horas más, hasta su fijación con paraformaldehído 4 % durante 30 minutos. Después de ser lavadas con PBS 1x fueron tratadas con HCl 2 N durante 5 minutos a 37° C, bloqueadas e incubadas con el anticuerpo primario anti-BrdU (Abcam, 1/100), seguido del anticuerpo secundario anti-Rata-Alexa 488 (Molecular Probes, 1/500) y teñidas con DAPI (Cambiochem, 1/1000). Se tomaron 20 fotografías con un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital Olympus DP50, de 20 campos distintos y de manera aleatoria. El número de células marcadas se contabilizó utilizando el programa *Image J*.

• Ensayo de MTT

La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) con el kit *Cell Proliferation Kit I* (Roche), el cual puede utilizarse tanto para medir proliferación como viabilidad celular. Se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT (amarillo) a formazán (azul). Las células (4.000 células/pocillo) se crecieron en placas de 96 pocillos a varios tiempos, tras los cuales se añadió MTT (0,5 mg/ml) al medio de cultivo durante 4 horas, tiempo en el que se forman los cristales de formazán. Pasadas esas 4 horas se añadió la solución de solubilización y se incubó a 37° C durante toda la noche, la absorbancia se midió a 550 nm en un lector de placas ELISA. La concentración de TDZD-8 usada fue de 20 μ M en el caso de las células GL261, A172 y U373.

• Estudios de ciclo celular

Para analizar la progresión a través del ciclo celular, las células GL261 fueron crecidas 24 horas en medio normal y fijadas con etanol frío al 70%, se centrifugaron y se resuspendieron en suero salino PBS 1x con 10 μ g/ml RNAsa (Sigma) y 0,003 % de yoduro de propidio (Sigma), como describimos previamente (Pignatelli et al., 2001). La distribución del contenido del DNA fue determinada mediante citometría de flujo (Cyan MLE-R, DAKO).

8. Inmunocitoquímica

Las células GL261 fueron crecidas durante 48 horas en cristales, dentro de placas de 24 pocillos. A continuación, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 30 minutos. Después de ser lavadas con PBS 1x fueron bloqueadas e incubadas con el anticuerpo primario anti-C/EBP β (Santa Cruz, 1/100), seguido del anticuerpo secundario anti-Conejo-Alexa 488 (Molecular Probes, 1/500) y teñidas con DAPI (Cabiochem, 1/1000). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio confocal Radiance 2100 (Bio-Rad)

9. Análisis de apoptosis

Para determinar el número de células que entran en apoptosis, se realizaron dos ensayos distintos: TUNEL y niveles de caspasa 3-activa, las células GL261 fueron tratadas o no con TDZD-8 y crecidas en cristales dentro de placas de 24 pocillos. Pasadas 24, 48 o 72 horas fueron lavadas con PBS 1x y fijadas 30 minutos con paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente. Para los análisis de TUNEL se utilizó el kit *In situ Cell Death Detection* (Roche) y se siguió el protocolo de la casa comercial. Para analizar los niveles de caspasa 3 activa se realizaron estudios de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-caspasa 3-activada de R&D System a una concentración de 1/500 durante una hora a una temperatura de 37° C; a continuación se realizó una incubación con el anticuerpo secundario Alexa-488 (Invitrogen) y se tiñeron las células con DAPI durante 45 minutos a 37° C. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio de fluorescencia Nikon90i acoplado a una cámara Nikon DS-Qi1Mc. Para comparar la señal de fluorescencia de las diferentes preparaciones, las condiciones para la adquisición de las diferentes imágenes fue la misma para todas las muestras. Algunos cultivos fueron tratados con el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk (Promega) a 10 μ M, dos horas antes del tratamiento con TDZD-8.

10. Ensayo de crecimiento en agar blando

Para realizar los experimentos de crecimiento independiente de anclaje, se resuspendieron 50.000 células de C1 e I4 en 1ml de una mezcla de agar noble al 0,7 % y medio de cultivo 2 x con 10 % de suero. Las células se sembraron en placas de 60 mm sobre una base de 2 ml de agar noble al 1 % en medio de cultivo. El medio semisólido se mantuvo húmedo añadiendo medio completo y 400 μ g/ml de G418 cada 2-3 días, pasados 21 días las colonias formadas fueron teñidas con cristal violeta al 0,005 %. A continuación,

se contabilizó el número de colonias en 20 campos elegidos aleatoriamente de cada placa. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

11. Ensayo de cicatrización de “herida” en placa

Las líneas C1 e I4 de ratón y FS y FC1 de humano, fueron sembradas en monocapa en placas de 35 mm y se dejaron crecer hasta llegar a confluencia. A continuación, se realizó una “herida” o incisión a modo de línea recta de manera transversal en la placa, con una punta de pipeta P200. Seguidamente se lavó la placa un par de veces con PBS 1x para descartar los restos celulares generados y se añadieron 2 ml de medio de crecimiento completo. El área abierta se fotografió en el microscopio Nikon TS1000 acoplado a una cámara Nikon DS-L1 digital, en el momento de la “herida” (0 horas) y a las 24 y 48 horas posteriores a dicha herida, para observar la migración de las células. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

12. Ensayos de invasividad

Estos ensayos se realizaron usando las denominadas cámaras *transwell* (Costar) con un diámetro de poro de 8 y 12 μm , en las que se añadió una capa de Matrigel libre de factores de crecimiento (BD Biosciences) a una concentración final de 250 $\mu\text{g/ml}$, en la cara superior del *transwell*. En la parte superior del matrigel solidificado fueron sembradas 50.000 y 100.000 células para los transwell de 8 y 12 μm respectivamente, en medio sin suero. A continuación, en el fondo de la cámara se añadió medio de cultivo con 20 % de suero fetal bovino. Las células se dejaron migrar hacia el medio con suero durante 48 horas, a continuación los filtros se fijaron con metanol y se eliminaron las células y el matrigel sobrante de la membrana, para posteriormente ser teñida con DAPI. Se contabilizó el número de células capaces de atravesar el matrigel y los poros de la membrana. Los experimentos fueron realizados por triplicado y fotografiados con un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital Olympus DP-50.

13. Separación electroforética de proteínas e inmunodetección (Western Blot)

La preparación de los extractos celulares totales, la electroforesis y la inmunodetección se llevó a cabo como se describe en (Cortes-Canteli et al., 2004). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 5, 8, 10 y 12 % bajo condiciones desnaturizantes y reductoras de SDS (SDS-PAGE). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en

este trabajo se describen en la [Tabla IV](#). El revelado se realizó por luminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos primarios de astrocitos, fueron cultivados y tratados 24 horas con lipopolisacarido (LPS) a una concentración de 10 µg/ml, tal y como se describe en (Luna-Medina et al., 2007). Parte de los cultivos de células GL261 tratados y no tratados con TDZD-8 fueron tratados también con el inhibidor PD98059 (Calbiochem) que bloquea la ruta MAPK, a una concentración de 80 µM una hora antes de empezar el tratamiento con 20 µM de TDZD-8.

En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, dos realizados.

Anticuerpo	Dilución	Origen	Procedencia
Anti-C/EBPα	1/500	Cabra	Santa Cruz Biotech.
Anti-C/EBPβ	1/250	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-C/EBPδ	1/500	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-Brca1	1/200	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-p27	1/500	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-ATM	1/1000	Ratón	Novus Biological
Anti-Chk2	1/1000	Ratón	Millipore-Upstate
Anti-p-ERK 1/2	1/1000	Conejo	Cell Signaling
Anti-ERK 1/2	1/1000	Conejo	Cell Signaling
Anti-p-p90RSK	1/1000	Conejo	Cell Signaling
Anti-p-GSK-3β	1/500	Conejo	Cell Signaling
Anti-GSK-3β	1/250	Conejo	BD Transduction
Anti-p21	1/1000	Conejo	Abcam
Anti-p53	1/500	Conejo	Novocastra
Anti-p-AKT1/2	1/1000	Conejo	Cell Signaling
Anti-AKT1/2	1/1000	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-EGR-1	1/1000	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-Oct-4	1/500	Conejo	Santa Cruz Biotech.
Anti-Musashi	1/1000	Conejo	Abcam
Anti-Nestina	1/2000	Conejo	Cedido por el Dr. M. Vallejo (IIB)
Anti-S100A4	1/500	Conejo	Abcam
Anti-Tubulina	1/5000	Ratón	Sigma

Anti-Ig Conejo-HRP	1/5000	Burro	Amersham Biosciences
Anti-Ig Ratón-HRP	1/5000	Conejo	Amersham Biosciences

Tabla IV. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo

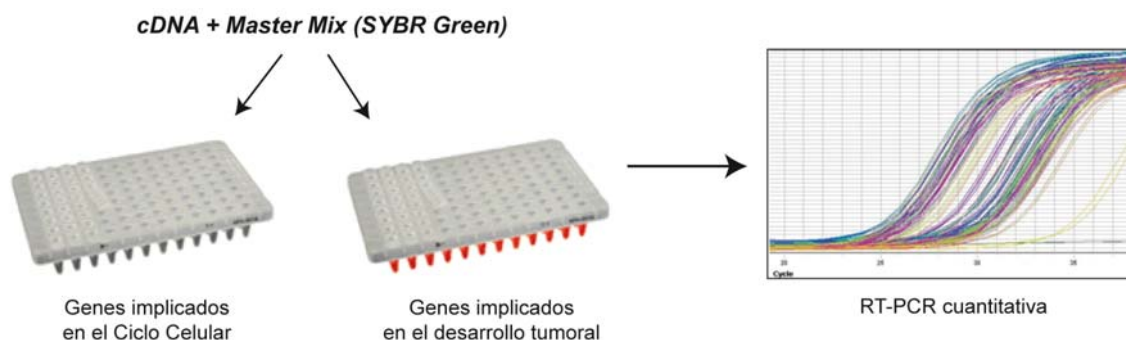
14. RT-PCR cuantitativa

El RNA total de las líneas C1 e I4, fue extraído mediante TRIzol (Invitrogen) y a continuación la contaminación por DNA genómico fue eliminada mediante el tratamiento con DNAsa. Para generar su correspondiente DNA complementario (cDNA) se partió de 1µg de RNA total y se retro-transcribió utilizando el kit *Superscript III* (Invitrogen). La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos y los niveles de RNA mensajero de C/EBPβ y de S100A4, fueron medidos en el aparato ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystem) utilizando sondas Taqman Gene Expresión Assay prediseñadas por el fabricante (Applied Biosystem). Dichas sondas han sido diseñadas específicamente para una secuencia, de acuerdo a las anotaciones correspondientes para cada gen, registradas en las bases de datos públicas y en Celera Genomics, y contienen dos cebadores para amplificar la secuencia de interés y una sonda marcada con un fluoróforo para detectarla. Utilizamos la mezcla de reacción de Applied Biosystem (*Master Mix*, que incluye la DNA polimerasa). Como controles endógenos de la expresión, se utilizaron las sondas *Taqman Endogenous Control* de β-Actina de humano y de ratón. Para calcular la expresión relativa de cada gen, se usó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los DNAs complementarios fueron cargados por triplicado para cada una de las sondas empleadas.

15. Análisis de la expresión génica (PCR-Array)

El *RT² Profiler PCR-Array* se basa en realizar una RT-PCR cuantitativa en una placa de 96 pocillos, donde cada pocillo contiene a su vez los cebadores de 84 genes de interés que vienen predeterminados por la casa comercial, el resto de pocillos hasta 96 son controles de contaminación por DNA genómico y controles endógenos de la expresión: β-Glucuronidasa (*Gusb*), Hipoxantina guanina ribosiltransferasa 1 (*Hprt1*), Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y β-Actina. Los PCR-Array que adquirimos fueron *Mouse Cell Cycle PCR Array* y *Mouse Cancer Pathway Finder PCR Array*, ambos fueron obtenidos de SuperArray Bioscience Corporation (Quiagen) La RT-PCR cuantitativa del Array se llevó a cabo utilizando el aparato ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystem) siguiendo el protocolo de la casa comercial y utilizando *SYBR Green* en la

Master Mix (contiene la DNA polimerasa) para su detección. Las líneas utilizadas para los PCR-Array fueron C1 e I4, donde la extracción de RNA y la síntesis del cDNA se realizaron como se describe en el apartado anterior. Para calcular la expresión relativa de cada gen, se usó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los PCR-Array se realizaron por duplicado para cada una de las líneas.



Esquema 1. Esquema representativo del ensayo PCR-Array.

16. Inducción de glioblastomas *in vivo* mediante inyección estereotáxica en ratones

Para inducir la formación de glioblastomas *in vivo* se inyectaron 100.000 células de las líneas C1 e I4 (para el estudio de C/EBP β), o 125.000 células de la línea GL261 (para el estudio del efecto del compuesto TDZD-8), en 2,5 μ l de PBS 1x a una velocidad de 1 μ l/minuto, en el estriado del hemisferio izquierdo de ratones machos adultos C57BL/6 ($n = 5$ por grupo para C1 e I4 y $n = 10$ por grupo para la línea GL261). Los animales fueron previamente anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (60 mg/Kg) y medetomidina (0,5 mg/Kg) y las coordenadas utilizadas en el aparato estereotáxico (Kopf Instruments) fueron Bregma: -1,06 mm posterior, 3 mm lateral izquierdo y 3 mm de profundidad, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). La progresión del tumor, generado por las células C1 e I4, fue seguida mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 11, 15 y 18 días después de la inyección. Aquellos ratones en los que se inyectaron las células GL261, fueron divididos en dos grupos: el grupo tratado y el grupo control. Un grupo de animales se trató con 5 mg/Kg de TDZD-8 (mediante inyección intraperitoneal) todos los días durante 20 días. El tratamiento se inició al día siguiente del implante de las células GL261. Los animales controles fueron inyectados una vez al día intraperitonealmente con DMSO, durante 20 días. La progresión del tumor se siguió mediante resonancia magnética nuclear (RMN) a 8, 10, 13 y 20 días

después de la inyección. Otro grupo de animales, fue tratado con 5 mg/Kg de TDZD-8 seis días después de la implantación, durante siete días, los tumores fueron seguidos también por RMN (4, 6, 8, 11 y 13 días después de la inyección).

Todos los ensayos fueron realizados siguiendo la directiva 86/609/EEC del Consejo de la Comunidad Europea. Se prestó especial atención en minimizar el sufrimiento animal.

17. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las imágenes de RMN se obtuvieron en un escáner de 7.0 Teslas (16 cm) horizontal Bruker Pharmascan utilizando el programa *Paravision v4.0* (Bruker). Los ratones machos adultos (n = 10 por grupo) fueron anestesiados con 2 % de isoflurano en 99,9 % de O₂ mediante mascarilla de plástico. A los animales se les permitió respirar de manera espontánea durante todo el experimento y se colocaron en un lecho con calor para mantener la temperatura corporal en aproximadamente 37° C. El estado fisiológico de los animales fue monitorizado durante la adquisición de todas las imágenes mediante el monitor fisiológico *Biotring* (Brucker). Las imágenes pesadas en T1 fueron tomadas tras la administración del agente de contraste gadolinio-DTPA a diferentes días después de la inyección intracraneal. Cada imagen tiene un grosor de 1 mm y se tomaron 16 imágenes por animal con una matriz de adquisición 256x256. El área del tumor fue calculada mediante el programa *Image J* y el volumen fue estimado sumando las diferentes áreas del tumor, multiplicadas por el grosor de la imagen. El volumen medio fue calculado para cada condición.

18. Histología e Inmunohistoquímica

Secciones de 10 µm del tumor fijadas con 4 % de paraformaldehído y embebidas en parafina, fueron desparafinadas en xilol, rehidratadas en una serie creciente de alcoholes y lavadas en agua destilada. Parte de las secciones fueron contrastadas con hematoxilina y eosina para su análisis histológico y otras fueron utilizadas para la detección de proliferación y apoptosis en el tumor mediante análisis de inmunohistoquímica. La proliferación fue medida con el anticuerpo específico anti-PCNA (1/50, Signet Laboratorios) y la apoptosis mediante anti-caspasa 3-activa (1/200, R&D Systems). Todos los análisis inmunohistoquímicos se realizaron como se ha descrito previamente (Luna-Medina et al., 2007), utilizando un anticuerpo secundario biotinilado y el protocolo de avidina-biotina del kit *Vectastain ABC* (Vector Laboratorios) como sistema de detección.

Para la cuantificación de la expresión de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) y caspasa 3-activa, se contaron el número de células positivas de 20 campos aleatorios diferentes. Las muestras se analizaron en un microscopio Nikon 90i acoplado a una cámara Nikon DS-Qi1Mc.

19. Estadística

Los resultados tanto de los estudios *in vitro* como *in vivo* se analizaron estadísticamente.

Dado el tamaño de la muestra, en los experimentos *in vitro* se utilizó la distribución *t de Student* de dos colas. Los niveles de significancia estadística se establecieron con los siguientes valores de *p*: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

En los experimentos *in vivo*, la estimación del tiempo de supervivencia se determinó mediante el cálculo de curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) y la significancia estadística de las diferencias en la supervivencia de los grupos se determinó mediante el test de Log-Rank (Mantel and Ciminera, 1979). Consideramos como diferencias estadísticamente significativas los valores de $p < 0,05$.

Resultados

1. C/EBP β como posible nueva diana para el tratamiento de glioblastomas

1.1 La interferencia de C/EBP β disminuye la proliferación y la viabilidad de las células de glioblastoma

El papel de C/EBP β en el desarrollo tumoral es, durante los últimos años, un tema importante de debate. Existen resultados en la literatura que lo postulan como un gen promotor de tumores mientras que otros sugieren que podría estar implicado en parada del crecimiento. En concreto en el caso de glioblastomas, hasta la fecha no existe prácticamente ningún dato. Teniendo en cuenta estos antecedentes, junto con el hecho de que nuestro grupo ha demostrado que C/EBP β tiene un papel importante en cerebro, quisimos analizar si este factor de transcripción podría estar implicado en el desarrollo de tumores en el sistema nervioso central, en concreto en glioblastomas. Para ello, realizamos estudios *in vitro* analizando primero los niveles de expresión de C/EBP β en la línea de glioblastoma de ratón GL261. Nuestros resultados muestran unos niveles elevados de C/EBP β en las células GL261 en comparación con cultivos primarios de astrocitos y niveles similares a astrocitos tratados con lipopolisacárido (LPS) (Figura 1A), el cual se sabe que es un potente inductor de la expresión de este gen. Al analizar la localización intracelular de C/EBP β en células GL261 por análisis de inmunofluorescencia observamos que se localizaba fundamentalmente en el núcleo, lo cual está de acuerdo con su papel como factor de transcripción (Figura 1B). Con objeto de analizar los efectos de C/EBP β en líneas celulares de glioblastoma, tanto de ratón como humanas, realizamos transfecciones estables con construcciones conteniendo shRNAs para C/EBP β . Para analizar su papel en la línea GL261, transfectamos de manera estable el vector pSilencer conteniendo el shRNA de C/EBP β (ver Materiales y Métodos). Este vector confiere resistencia a geneticina, así que una vez seleccionadas las líneas que incorporaron el vector, se evaluó la eficiencia de la transfección para el silenciamiento de C/EBP β mediante análisis por Western Blot usando un anticuerpo específico contra C/EBP β . El inmunoblot que se presenta en la Figura 1C, muestra que 2 de esas líneas (I4 e I5) presentan una disminución en la expresión de C/EBP β de aproximadamente un 75 % en comparación con líneas controles (C1 y C2), que han sido transfectadas con el mismo vector pero que no producen un RNA de interferencia efectivo. Por esta razón elegimos las líneas C1, I4 e I5 para los estudios posteriores. En paralelo, decimos analizar el papel de C/EBP β en la línea de glioblastoma

humano LN18, para analizar si el efecto de C/EBP β era el mismo que en una línea de ratón. Para ello disminuimos la expresión de C/EBP β mediante vectores lentivirales que contienen el shRNA específico para su mRNA (ver Materiales y Métodos). En la [Figura 1C](#) se muestran los niveles de expresión C/EBP β , y como se puede observar hay una disminución en los niveles de proteína de aproximadamente un 90 % en la línea interferida en C/EBP β (FC1), en comparación con los niveles de la línea control (FS) ([Figura 1D](#)).

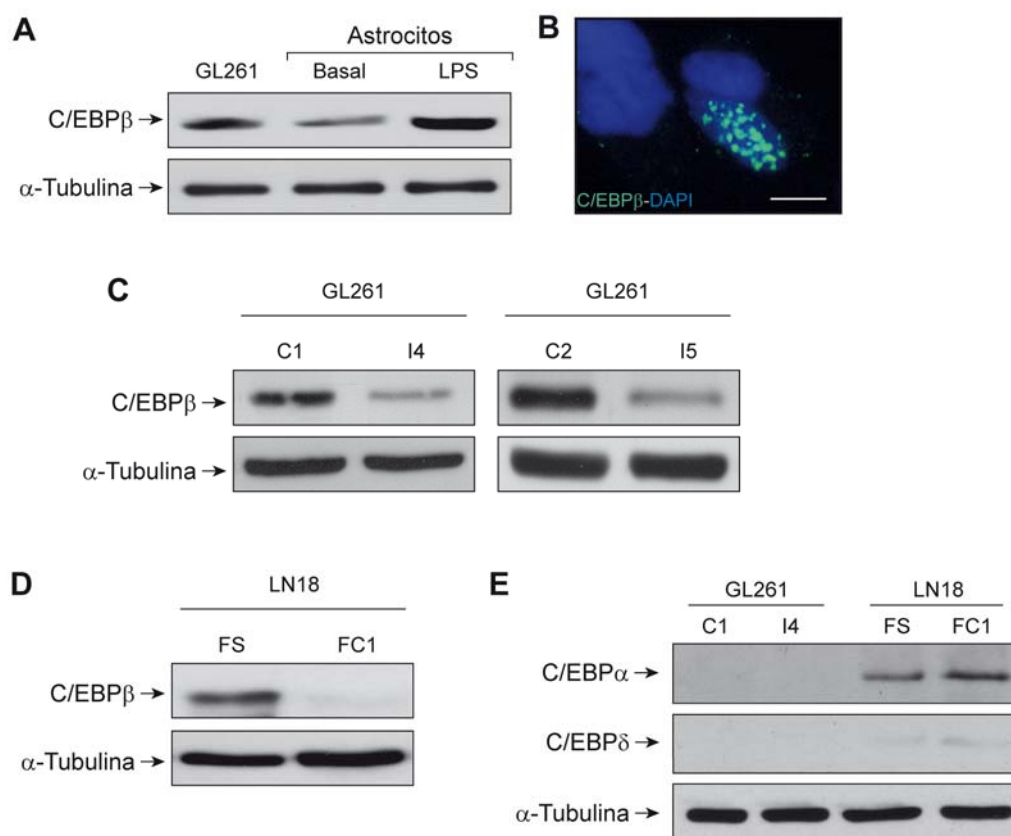


Figura 1. Expresión de C/EBP β . (A) Niveles de expresión de C/EBP β (LAP2) determinados mediante Western Blot en células de ratón GL261. La línea GL261 expresa niveles de C/EBP β similares a los observados en astrocitos primarios tratados durante 24h con lipopolisacárido (10 μ g/ml, LPS). Los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados y cultivados como se describe en Materiales y Métodos (B) Imagen de microscopia confocal que muestra que este factor de transcripción se localiza en el núcleo (puntos verdes). Barra de escala 10 μ m. (C) Análisis por Western Blot de la expresión de C/EBP β en células GL261 controles (C1, C2) e interferidas en C/EBP β (I4, I5). El inmunoblot mostrado es una imagen representativa de 3 experimentos distintos. (D) Expresión de C/EBP β en la línea de glioblastoma humano LN18 control (FS) e interferida en C/EBP β (FC1) (E) Inmunoblot representativo de la expresión de C/EBP α y C/EBP δ , en la línea GL261 (C1 e I4) y en la línea LN18 (FS y FC1).

Para confirmar la especificidad del shRNA usado y demostrar que los efectos que veíamos no se debían a la interferencia o modulación de otros miembros de la familia C/EBP, decidimos analizar por Western Blot los niveles de proteína de C/EBP α y C/EBP δ en ambas líneas celulares (Figura 1E), ya que ambos miembros están también implicados en tumorigénesis. Como se puede ver en esta Figura, la línea GL261 no presenta niveles apreciables de ninguna de las dos proteínas (C/EBP α o C/EBP δ). Por el contrario, la línea de glioblastoma humano LN18 presenta niveles significativos de C/EBP α y bajos niveles de C/EBP δ . No detectamos diferencias en los niveles de proteína entre la línea control y la interferida.

A continuación, analizamos si la proliferación de las células de glioblastoma se encuentra afectada directamente por C/EBP β . Aunque la disminución en el contenido de C/EBP β no altera la morfología celular en las líneas I4 e I5 (Figura 2A) sí disminuye la proliferación tal y como demuestran los experimentos de incorporación de BrdU (Figura 2). La Figura 2B muestra que la incorporación de BrdU, medida mediante ELISA, disminuyó un 50 % en las líneas I4 e I5, en comparación con las células control, C1. Para confirmar estos resultados, estudiamos también la incorporación de BrdU mediante experimentos de inmunocitoquímica y posterior cuantificación de las imágenes, como se describe en Materiales y Métodos. De manera similar a los resultados obtenidos mediante análisis de ELISA, los estudios de inmunocitoquímica indicaron también que la incorporación de BrdU es de aproximadamente un 50% menor en las líneas interferidas, comparadas con la línea control (Figura 2C).

Además, ensayos de viabilidad celular, mediante el ensayo de MTT (ver Materiales y Métodos) mostraron una disminución significativa en el número de células viables en las líneas interferidas en C/EBP β (I4 y FC1) en comparación con las líneas control (C1 y FS) (Figura 2D). Estos resultados indican que C/EBP β juega un papel importante en la proliferación y viabilidad de células de glioblastoma tanto de ratón como humanas.

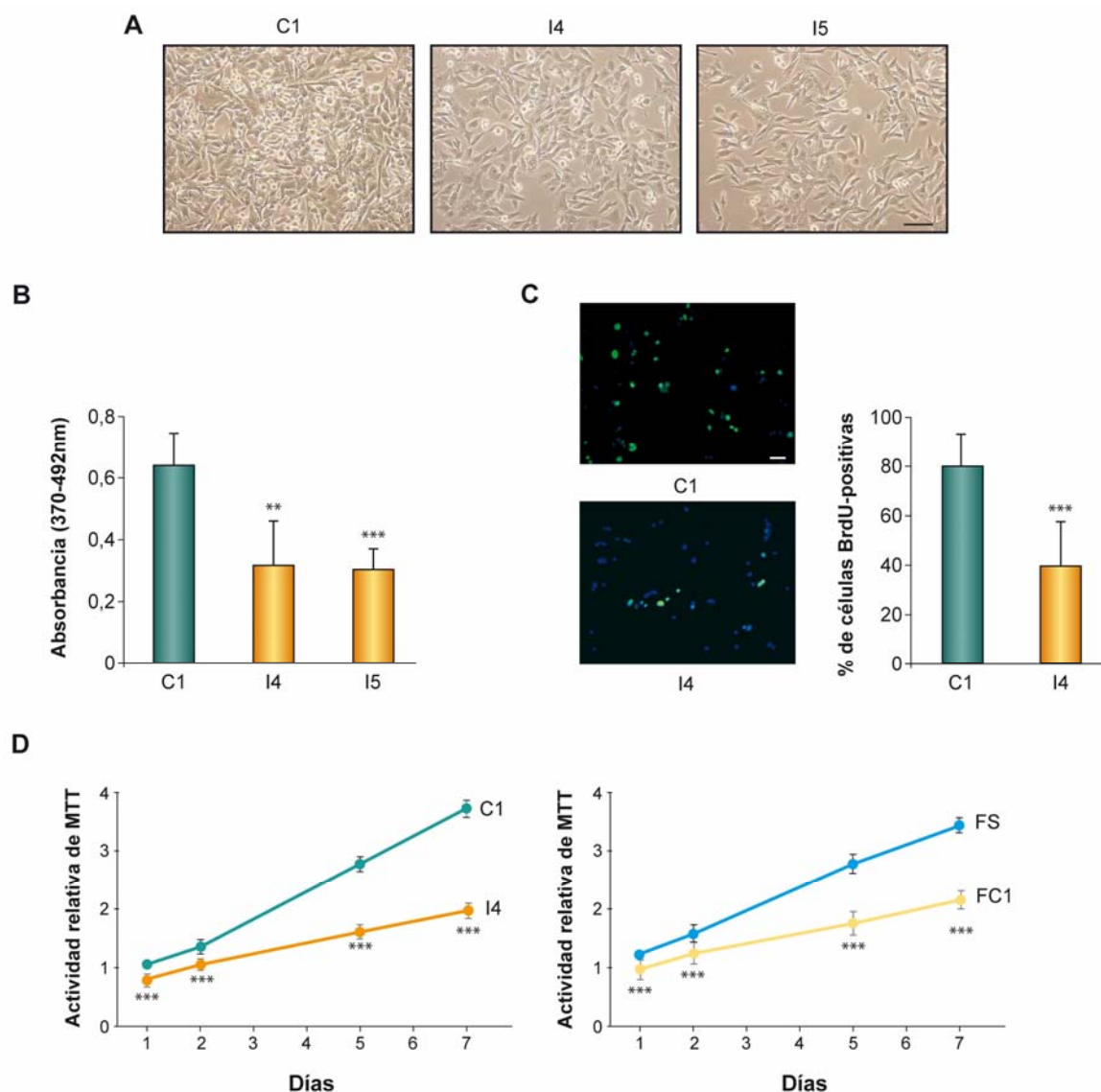


Figura 2. Efecto de la disminución de la expresión de C/EBPβ en la proliferación y viabilidad celular (A) La interferencia de C/EBPβ en células GL261 (I4 e I5) no causa un cambio en la morfología de estas células con respecto a su control, C1. Barra de escala, 100 μm. (B) Las líneas C1, I4 e I5 fueron sembradas en placas de 96 pocillos y cultivadas durante 24 h, tras las cuales se añadió BrdU (10 μg/ml) al medio de cultivo. Las células se cultivaron 16 h después de la adición de BrdU. Se indica el valor medio ± DS. * $p < 0,05$ (C) Tras crecer las líneas C1 e I4 sobre cristales, se incubaron con BrdU durante 16 h y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Las fotografías muestran un campo representativo de inmunofluorescencias llevadas a cabo usando un anticuerpo específico contra BrdU (verde) y contra-tiñendo los núcleos con DAPI (azul). Barra de escala 50 μm. Las células interferidas en C/EBPβ (I4) muestran una significativa reducción en la proliferación como se observa en la cuantificación del porcentaje total de células BrdU⁺ (** $p < 0,001$). (D) Las líneas de ratón C1 e I4 y de humano FS y FC1, fueron sembradas en placas de 96 pocillos y su viabilidad celular fue medida mediante ensayos de MTT a distintos tiempos.

Una vez observado el efecto de C/EBPβ sobre la activación de la proliferación, estudiamos qué fases del ciclo celular podría estar alterando. Para ello analizamos el ciclo celular de las células controles e interferidas en C/EBPβ, creciendo de forma exponencial (en presencia de suero) mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que

aquellas células con bajos niveles de C/EBP β presentan una acumulación de células en fase G0/G1 (58,44 % en células interferidas frente a un 40,32% en células control) (Figura 3). También observamos que la línea I4 presentaba una disminución en el número de células que entran en fase S y por lo tanto un menor número de células capaces de progresar en la fase G2/M del ciclo celular, en comparación con la línea control, C1.

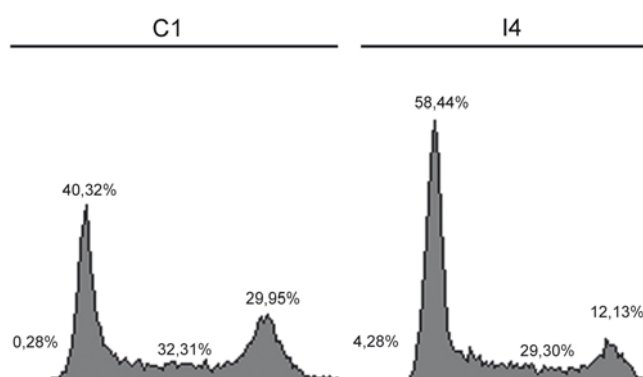


Figura 3. Histograma representativo del efecto de C/EBP β en la distribución del ciclo celular de las células GL261. Las células controles C1 e interferidas en C/EBP β I4, fueron crecidas 24 h en medio normal y el contenido en DNA fue determinado por citometría de flujo. Imagen representativa de 3 experimentos distintos.

1.2 La interferencia de C/EBP β disminuye la capacidad de las células de glioblastoma de crecer de forma independiente de anclaje.

La capacidad de las células tumorales para crecer sin adherirse a las proteínas de la matriz extracelular (crecimiento independiente de anclaje) se correlaciona estrechamente con su malignidad. El crecimiento independiente de anclaje permite a estas células invadir y metastatizar, dos de las características más importantes de una célula tumoral. Para evaluar el efecto de la disminución de los niveles de proteína de C/EBP β en el crecimiento independiente de anclaje de las células GL261, se crecieron las líneas C1 e I4 en medio semisólido de agar (0,7 %) y se contaron las colonias formadas a los 21 días. Como se muestra en la Figura 4, se observa una reducción significativa en el número y el tamaño de las colonias formadas por las células interferidas en C/EBP β (I4) en comparación con las generadas por la línea control (C1) (45 ± 7 y 120 ± 9 colonias/placa, respectivamente). Estos datos sugieren que la disminución de C/EBP β tiene como consecuencia una menor capacidad de transformación de las células GL261.

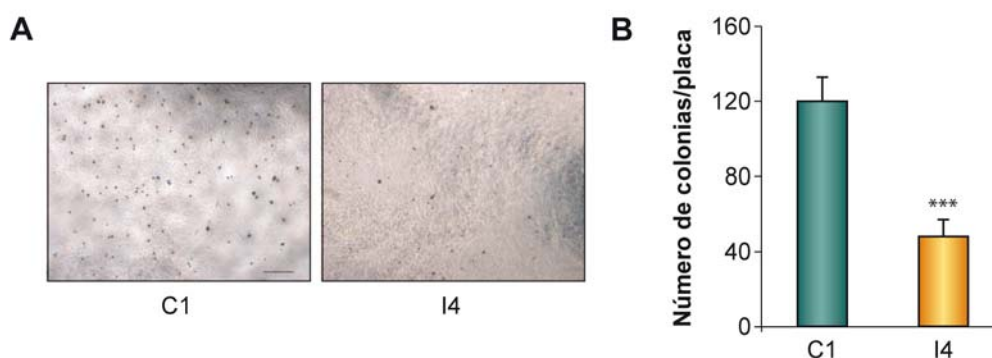
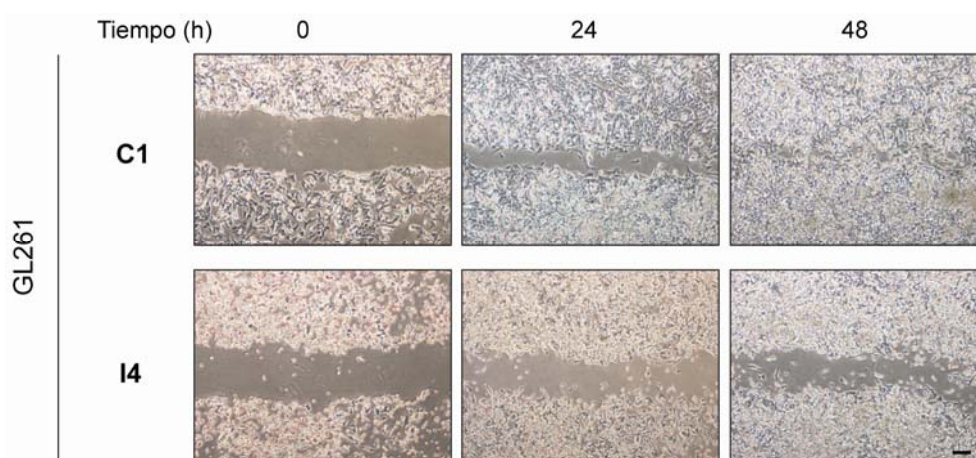


Figura 4. Efecto de la expresión de C/EBPβ en la clonogenicidad de las células de glioblastoma GL261. Tres semanas después de sembrar las líneas C1 e I4 en agar blando las colonias formadas se tiñeron con cristal violeta. (A) Microfotografías representativas de las colonias formadas en ambos tipos celulares muestran que las células interferidas en C/EBPβ, I4, presentan un menor crecimiento independiente de anclaje. Barra de escala, 250 μm. (B) La cuantificación del número de colonias se llevó a cabo contando las colonias presentes en 20 campos seleccionados aleatoriamente. Se presenta el valor medio ± DS. *** $p < 0,001$

1.3 La interferencia de C/EBPβ disminuye la motilidad y la capacidad de invasión de las células de glioblastoma

La capacidad de las células de glioblastoma para invadir el tejido normal circundante depende de su motilidad, así como de su capacidad de penetrar a través de la matriz extracelular. Para evaluar el papel de C/EBPβ en la motilidad de las células de glioblastoma, realizamos los denominados “ensayos de herida en placa”. Como muestra la [Figura 5](#), las células GL261 y LN18 interferidas en C/EBPβ (I4 y FC1, respectivamente) no son capaces de repoblar la herida tan rápidamente como las células controles (C1 y FS), sugiriendo una disminución de la motilidad celular e indicando que la deficiencia de C/EBPβ reduce la capacidad de migración de las células de glioblastoma.



(La [figura 5](#) continúa en la página 63)

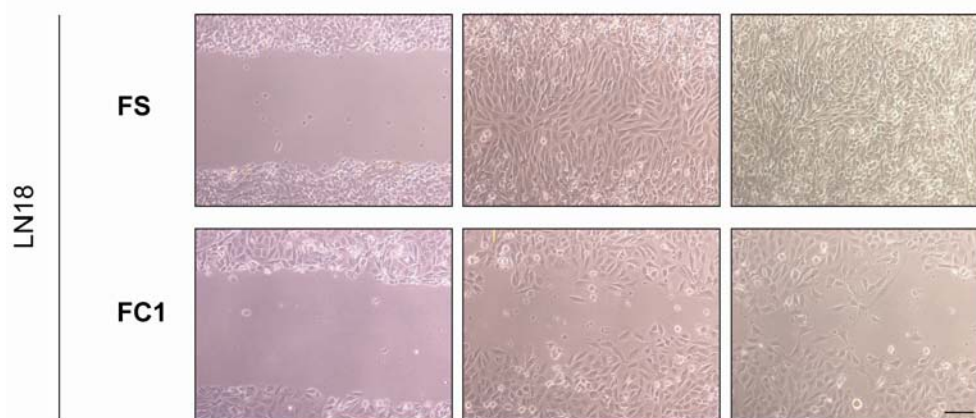


Figura 5. Efecto de C/EBPβ en la motilidad celular. Las líneas de ratón C1 e I4 y de humano FS y FC1, fueron crecidas en monocapa y se realizó una “herida en placa” utilizando una punta de pipeta de plástico. Se fotografiaron con un microscopio de contraste de fases a diferentes tiempos después de realizar la herida. Barra de escala, 100 μ m.

A continuación determinamos la capacidad invasiva de estas células mediante la utilización de cámaras Transwell (ver Materiales y Métodos). En estos ensayos las células GL261 controles (C1) e interferidas en C/EBPβ (I4 e I5), se sembraron en cámaras Transwell cubiertas de Matrigel y se determinó el número de células capaces de atravesar la membrana, recubierta con Matrigel, pasadas 48 horas. Nuestros resultados muestran que aquellas células interferidas en C/EBPβ (I4 e I5) tenían una menor capacidad de atravesar dicha membrana en comparación con la línea control (C1), indicando por tanto que la deficiencia de C/EBPβ reduce significativamente la motilidad y capacidad de invasión de células de glioblastoma (Figura 6).

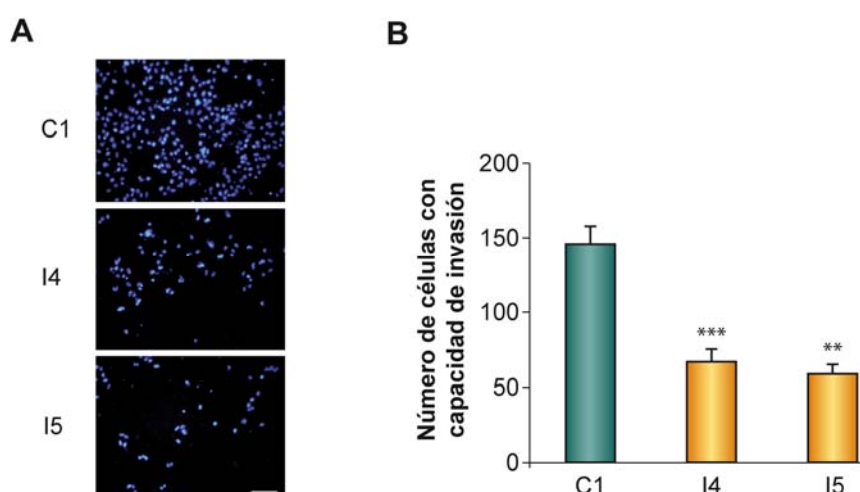


Figura 6. Efecto de C/EBPβ en la capacidad de invasión. La invasión celular de las líneas C1, I4 e I5 fue analizada mediante cámaras Transwell cubiertas con matrigel como se describe en Materiales y Métodos. (A) Microfotografías representativas de las células capaces de atravesar la membrana. Barra de escala, 100 μ m. (B) La cuantificación del número de células con capacidad invasiva se llevó a cabo contando al menos 10 campos de cada membrana. Se presenta el valor medio \pm DS, de tres experimentos distintos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

1.4 Estudio de los genes implicados en el efecto de C/EBP β sobre la proliferación, viabilidad y capacidad invasiva de las células GL261

Para analizar el mecanismo de acción por el cual C/EBP β regula la proliferación, viabilidad y capacidad invasiva de las células GL261, llevamos a cabo un análisis de expresión de genes implicados en estos procesos, mediante estudios de niveles de RNA mensajero específico en las diferentes líneas. Para ello utilizamos *PCR Arrays* (ver Materiales y Métodos) de ciclo celular y de genes implicados en el desarrollo tumoral. En la [Tabla 1](#), se muestran algunos de los genes que hemos encontrado regulados por C/EBP β . Entre los genes cuya expresión se encuentra significativamente aumentada en las células interferidas en C/EBP β se encontraban el gen mutado de la ataxia telangiectasia (Atm), *Breast Cancer 1* y *2* (Brca1 y Brca2), los genes de las serinas/treoninas quinasas *checkpoint 1* y *2* (Chk1 y Chk2) y el inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina (p27). Todos ellos están implicados en parada del ciclo celular y reparación en respuesta a un daño en el DNA.

RNA mensajero	Ratio I4/C1 (valor medio)
Brca2, <i>Breast cancer 2</i>	6,45
Atm, gen mutado de la Ataxia Telangiectasia	6,41
Apaf 1, <i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	4,82
Cdkn1b, Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina, p27	3,51
Chk 1, quinasa checkpoint 1	3,46
Brca1, <i>Breast cancer 1</i>	1,91
Chk 2, quinasa checkpoint 2	1,61
Mcam 1, Molécula de adhesión celular de melanoma 1	0,53
Vegfc, factor de crecimiento endotelial vascular C	0,50
Plaur, <i>Plaminogen activator-urokinase receptor</i>	0,47
Itga 3, Integrina α 3	0,40
Itgb 3, Integrina β 3	0,32
S100A4, proteína de unión a calcio A4	0,04

Tabla 1 Efecto de C/EBP β en la expresión de genes de ciclo celular y reguladores del desarrollo tumoral. Se muestra el valor medio obtenido en el PCR-Array (Ver “Materiales y Métodos”) del cociente entre la línea control (C1) y la línea interferida en C/EBP β (I4).

También encontramos que la expresión de genes implicados en adhesión, invasión y metástasis como la integrina $\alpha 3$ (Itga3), integrina $\beta 3$ (Itgb3), la molécula de adhesión de melanoma 1 (Mcam1), Plaur (*plasminogen activator, urokinase receptor*) y la proteína de unión a calcio S100A4, se encuentra significativamente disminuida en las células interferidas en C/EBP β (I4). Curiosamente algunos de estos genes como Itgb3, Plaur y Mcam1, junto con Vegfc han sido implicados en la iniciación de la angiogénesis, lo que podría sugerir un papel de C/EBP β en el desarrollo y mantenimiento de glioblastomas.

A continuación, medimos los niveles de proteína de algunos genes representativos implicados en la parada del ciclo celular y reparación en respuesta a daño en el DNA, que encontramos regulados por C/EBP β . Experimentos de western blot mostraron que al igual que ocurría con los niveles de mRNA, los niveles de estas proteínas se encontraban significativamente aumentados en las líneas interferidas en C/EBP β (I4 e I5) (Figura 7). Estos datos indican que no solo los niveles de mRNA de estos genes están aumentados en las células deficientes en C/EBP β , sino también sus niveles de proteína, sugiriendo por tanto que C/EBP β , podría estar regulando el punto de restricción (*checkpoint*) G0/G1. Por tanto, se podría postular que la bajada en los niveles de este factor de transcripción tendría como resultado una disminución en la progresión del ciclo celular y una regulación de los mecanismos implicados en la reparación del daño al DNA.

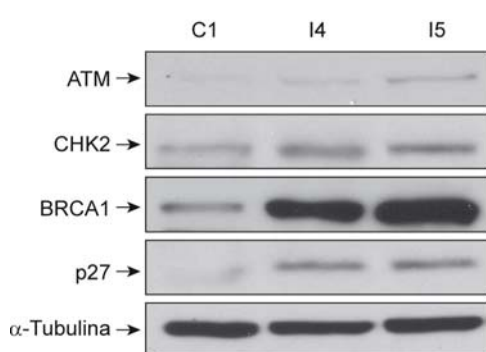


Figura 7. Análisis de expresión de diferentes genes implicados en parada de ciclo celular. Los extractos de proteínas de las líneas C1, I4 e I5 fueron utilizados para análisis por Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra ATM, CHK2, BRCA1 y p27, como se indica en Materiales y Métodos. Imágenes representativas de 2 experimentos distintos.

1.5 La interferencia de C/EBP β disminuye el crecimiento de las células GL261 *in vivo*

A la vista de los resultados obtenidos *in vitro*, indicando que C/EBP β juega un papel importante en el crecimiento de células derivadas de glioblastoma, a continuación estudiamos el papel de C/EBP β *in vivo* en el desarrollo de este tipo de tumores. Para ello, implantamos ortotópicamente en el cerebro de ratones adultos las líneas derivadas de las

células GL261 (control, C1 e interferida en C/EBP β , I4) y comparamos el desarrollo de los gliomas generados por ambas líneas.

El modelo de glioma de ratón con células GL261 ha sido el modelo de trasplante singénico más comúnmente utilizado tanto para tumores intracraneales como subcutáneos (Edwards et al., 2002; Kjaergaard et al., 2000; Miyatake et al., 1997). Este modelo intracraneal presenta muchas de las características histopatológicas y biológicas de un glioblastoma humano, incluyendo la aparición de necrosis rodeadas por agrupaciones de células en pseudoempalizada y la invasión del tejido cerebral adyacente al tumor por células aisladas y por grupos de células que pasan a situarse alrededor de los vasos sanguíneos (Zagzag et al., 2003). Nuestros resultados muestran que ratones inyectados ortotópicamente con las células I4 (interferidas en C/EBP β) presentaban un retraso significativo en la aparición y crecimiento del tumor, en comparación con los inyectados con las células control, C1 (Figura 8). Para analizar la progresión del tumor se monitorizó su crecimiento *in vivo* mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN). Las imágenes pesadas en T1 obtenidas tras la administración del agente de contraste gadolinio-DPTA, revelaron una significativa disminución del volumen del tumor en aquellos ratones implantados con las células con C/EBP β interferida (I4) en comparación con las células control (C1) (Figura 8A, B). La densitometría de las imágenes de RMN mostró una clara disminución del volumen del tumor a 11, 15 y 18 días después de la inyección estereotáxica de las células. Para analizar la supervivencia de los animales, se utilizaron los métodos estadísticos Log-Rank y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Según la estimación del tiempo medio de supervivencia observamos que aquellos ratones inyectados con la línea interferida en C/EBP β (I4) mostraron una supervivencia de 41 días *versus* 26,5 días de aquellos que fueron inyectados con la línea control (C1). Todos estos resultados demuestran que la progresión de los tumores generados a partir de la línea interferida en C/EBP β es menor que la de aquellos en los que los niveles de C/EBP β son normales y que los ratones inyectados con la línea I4 presentan una mayor supervivencia que aquellos implantados con la línea control C1.

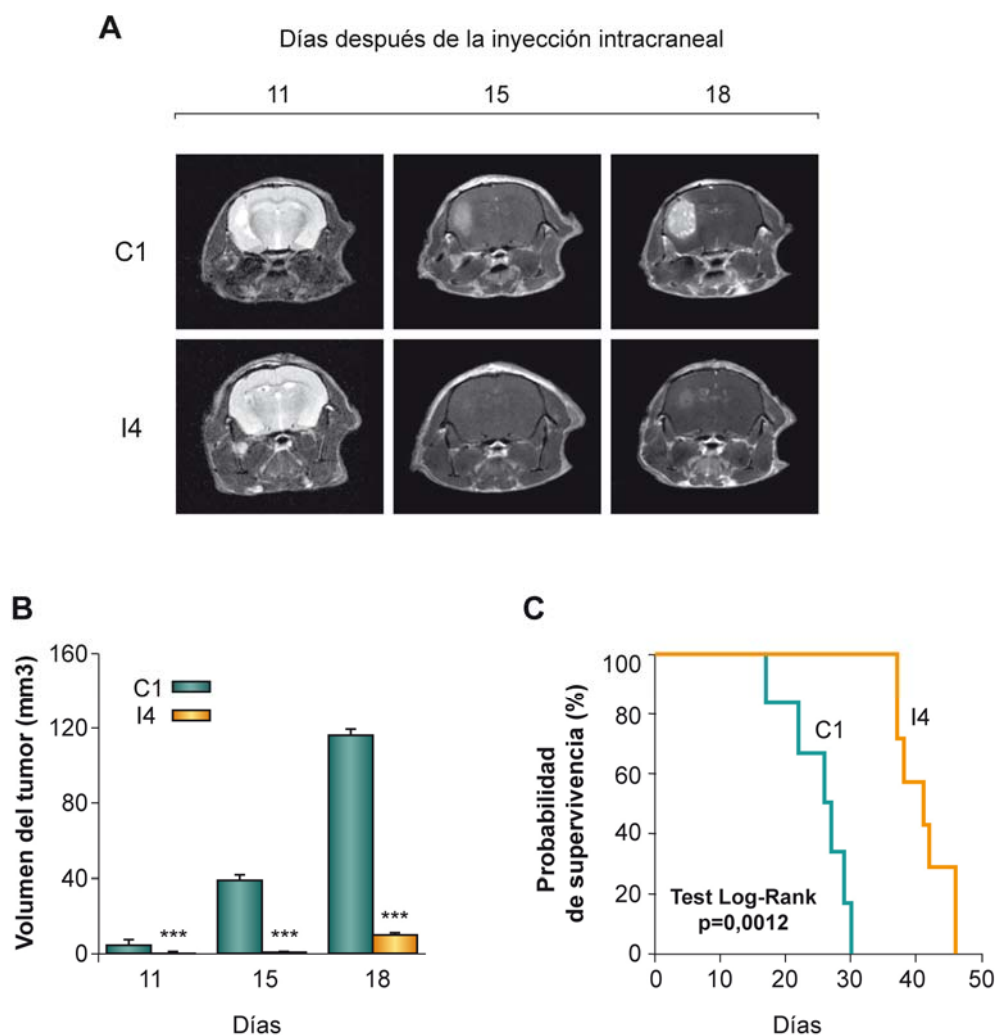


Figura 8. Efecto de la expresión de C/EBP β en el crecimiento de tumores *in vivo*. (A) Imágenes representativas de RMN a 11, 15 y 18 días después de la inyección intracraneal de 10^5 células de las líneas C1 e I4, en el hemisferio izquierdo de ratones adultos. Las imágenes pesadas en T1 se obtuvieron con un escáner de 7 Teslas como se describe en Materiales y Métodos. (B) Análisis cuantitativo del volumen total del tumor. Los valores representan el valor medio \pm DS de 5 animales diferentes. *** $p < 0,001$ (C) La curva de supervivencia de Kaplan-Meier y el análisis estadístico de supervivencia global (test Log-Rank) ponen de manifiesto que la carencia de C/EBP β (I4) mejora significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con sus controles (C1) (test Log-Rank $p = 0,0012$). La supervivencia media de los ratones inyectados con la línea interferida en C/EBP β , I4, fue de 41 días y de 26,5 días para los ratones inyectados con la línea control, C1.

El análisis histopatológico puso de manifiesto algunas diferencias entre los tumores generados a partir de las líneas control e interferida. Aunque ambos tumores, según el análisis anatomopatológico, se podrían definir como glioblastomas de grado IV, aquellos tumores generados a partir de las células interferidas en C/EBP β no presentaron formación de vasos, ni células gigantes multinucleadas, características típicas de glioblastomas de grado IV agresivos (Figura 9A). En esos tumores tampoco fueron detectados focos de necrosis en comparación con los tumores derivados de C1, 18 días después de la inyección.

Además, el marcaje con PCNA para la medida de proliferación fue significativamente menor en los tumores derivados de I4 que en los derivados de C1 (Figura 9B), lo que sugiere una vez más que la carencia de C/EBP β conduce a un efecto supresor del crecimiento en células de glioblastoma no solo *in vitro* sino también *in vivo*.

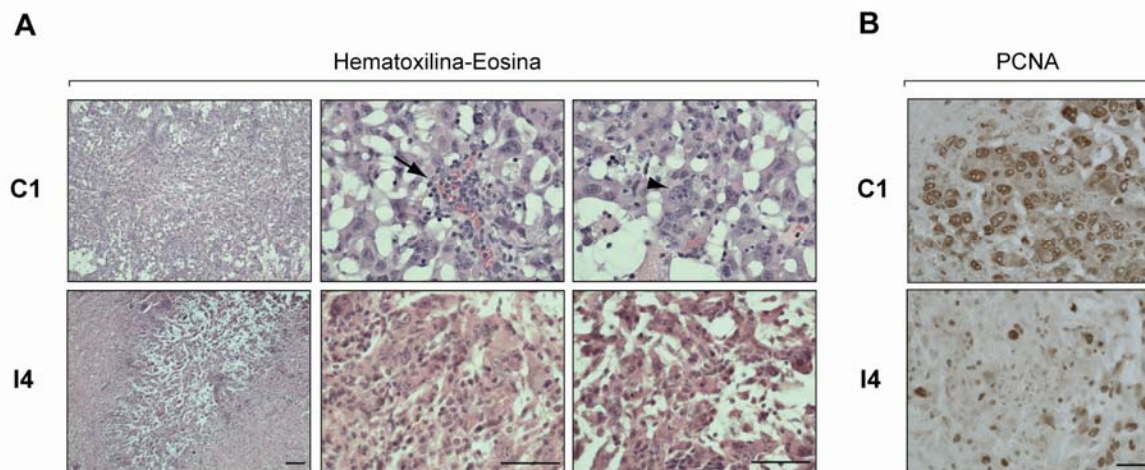


Figura 9. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los tumores inducidos por las líneas C1 e I4 derivadas de las células GL261. (A) Imágenes de tinción con hematoxilina-eosina de tumores generados por C1 e I4. Las imágenes centrales y de la derecha presentan un mayor aumento (60x) que las imágenes de la izquierda (10x). Barra de escala, 100 μ m. Los tumores generados por C1 presentan vasos sanguíneos (flecha) y células gigantes multinucleadas (punta de flecha), estructuras que no se aprecian en los tumores generados por I4. (B) El análisis inmunohistoquímico del marcador de proliferación PCNA muestra que los tumores generados por la inyección de células I4 presentan un menor grado de proliferación que los generados por C1. Barra de escala, 25 μ m.

1.6 La interferencia de C/EBP β *in vitro* disminuye la formación y la auto-renovación de las células madre derivadas de glioblastoma

En contra de la hipótesis de que los tumores tienen un origen clonal, estudios recientes sugieren que las células tumorales podrían organizarse en una jerarquía en la que una pequeña población sería capaz de iniciar y mantener la progresión del tumor. Estas ‘células iniciadoras’ presentan las mismas características que las células madre normales: son capaces de dividirse asimétricamente y de auto-renovarse, de ahí que hayan sido denominadas como las ‘células madre del cáncer’ (*Cancer Stem Cells, CSC*). Dado el interés del tema actualmente, y el hecho de que datos aún no publicados del laboratorio, indican que C/EBP β está implicada en la proliferación y diferenciación de células madre neurales en cerebro adulto normal (Cortes-Canteli et al. en revisión), a continuación estudiamos el posible papel de este factor de transcripción en la proliferación y capacidad de auto-renovación de la subpoblación de células madre presente en células de glioblastoma. Lo primero que analizamos fueron los niveles de expresión de C/EBP β en

cultivos de neuroesferas derivadas de glioblastoma de ratón (NSFG). Estudiamos para ello neuroesferas primarias derivadas de la línea control, C1, y de la línea interferida en C/EBP β , I4, (PC1 y PI4, respectivamente) para determinar si la interferencia de C/EBP β se mantenía también en estos cultivos. Al igual que en las células adherentes C1 e I4, obtuvimos una disminución de aproximadamente un 80% en la expresión de C/EBP β (Figura 10A) en la línea PI4. Para asegurarnos de que estábamos trabajando realmente con una población enriquecida en NSFG, analizamos por western blot los niveles del marcador de progenitores y células madre neurales, Musashi-1 (Axell et al., 2009). Las células adherentes C1 e I4, obtenidas a partir de la línea GL261, no presentaron expresión de dicha proteína (Figura 10B). Sin embargo, las poblaciones de NSFG si que resultaron ser positivas para este marcador, observándose una disminución en los niveles de Musashi-1 en la población interferida en C/EBP β (PI4) en comparación con su control (PC1). Estos resultados sugieren que C/EBP β podría estar implicada en la regulación de los niveles de células madre presentes en la línea celular GL261.

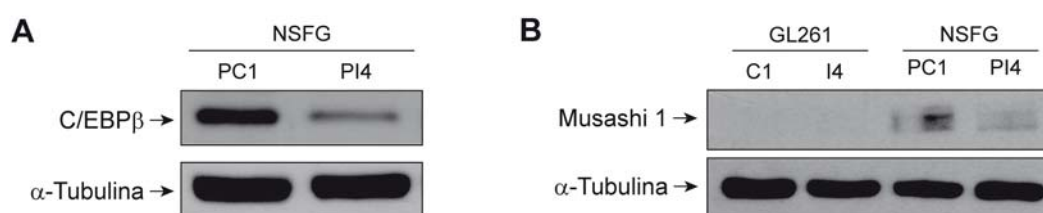


Figura 10. Análisis de expresión en neuroesferas del glioblastoma y células GL261. (A) Niveles de C/EBP β en NSFG de PC1 y PI4 (población control e interferida en C/EBP β , respectivamente). (B) Análisis comparativo del nivel de expresión del marcador de células madre neurales, Musashi 1, en lisados celulares de células adherentes C1 e I4 derivadas de la línea GL261 y de las poblaciones PC1, PI4 derivadas a su vez de C1 e I4 cultivadas en condiciones de NSFG. Imágenes representativas de 2 experimentos distintos.

A continuación, estudiamos el efecto de la interferencia de C/EBP β en la capacidad de formación y auto-renovación de las NSFG (Figura 11A). Las NSFG primarias, obtenidas según se detalla en Materiales y Métodos, fueron disgregadas y cultivadas de nuevo para analizar la formación de NSFG secundarias. Observamos que 14 días después de sembrar las células en un medio que favorece la formación de neuroesferas, el número de NSFG secundarias fue significativamente menor en aquellos cultivos derivados de la línea interferida I4 (PI4) comparado con la línea control (PC1) ($63 \pm 21,54$ y $235 \pm 46,52$, respectivamente) (Figura 11B). Por otro lado, la expresión de C/EBP β también regula la capacidad de auto-renovación de las NSFG, según se puede observar en la Figura 11C. Observamos que 7 y 14 días después de sembrar las NSFG a una dilución clonal, se obtuvo

un número significativamente mayor de NSFG en la población control PC1 que en la población interferida en C/EBP β PI4 (19 ± 3 y $8 \pm 2,5$, respectivamente).

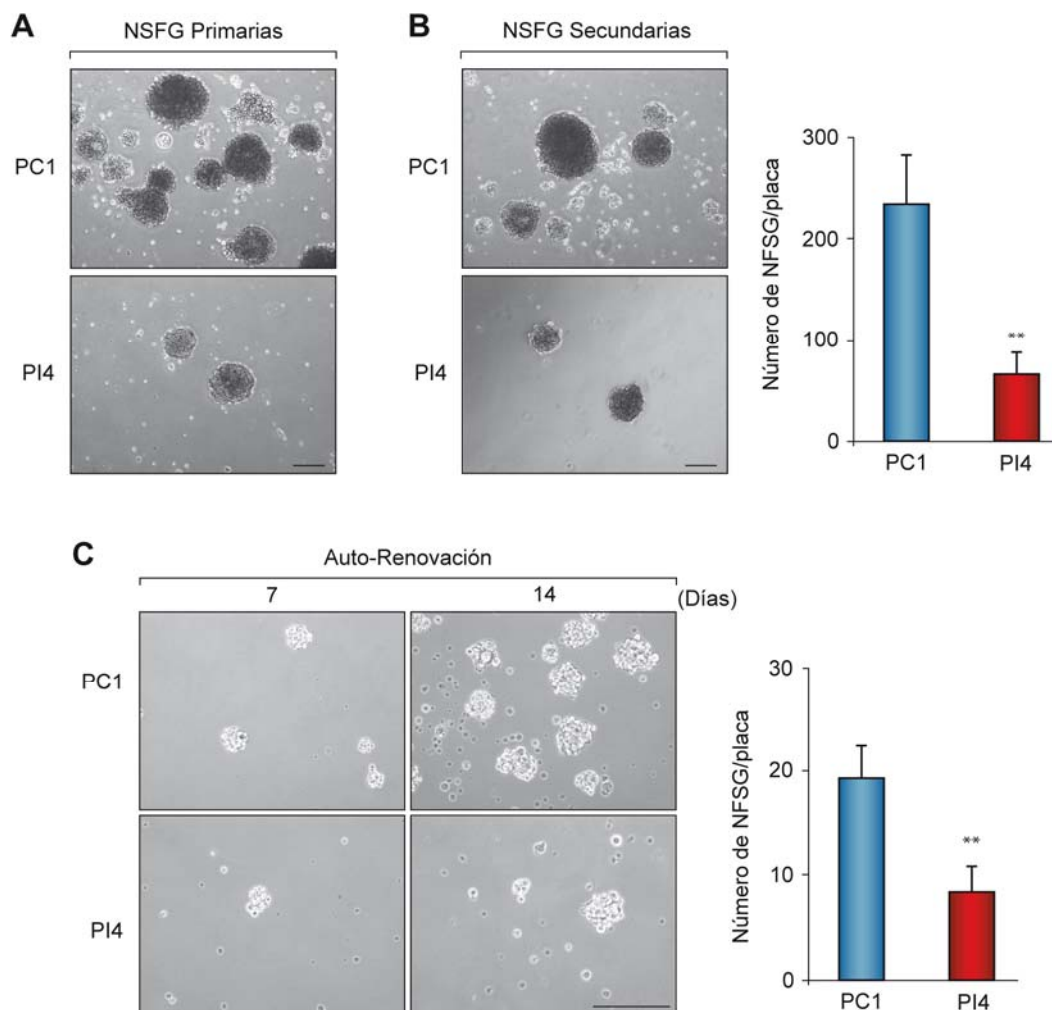


Figura 11. Efecto de C/EBP β en la formación de neuroesferas (NSFG) derivadas de células GL261.

Las NSFG fueron sembradas y crecidas en medio Ham's-F12/DMEM sin suero, suplementado con B27 y factores de crecimiento (20 ng/ml de EGF y FGF). (A) Imágenes representativas de NSFG primarias de la población control, (PC1) y la población interferida en C/EBP β (PI4). (B) Las NSFG primarias fueron disgregadas y crecidas durante 14 días para analizar la formación de NSFG secundarias. La cuantificación de las NSFG secundarias se llevó a cabo contando 12 campos aleatorios de 3 pocillos diferentes. Se presenta el valor medio \pm DS. (C) El ensayo de auto-renovación (Materiales y Métodos) muestra como la interferencia de C/EBP β disminuye la capacidad de formar NSFG tras 7 y 14 días en cultivo. La cuantificación de las NSFG tras 14 días en cultivo se llevó a cabo contando 12 campos aleatorios de 3 pocillos diferentes de placas de 12 pocillos. Barra de escala 250 μ m. ** $p < 0,01$

Esos resultados sugieren que una mayor expresión de C/EBP β resulta en un aumento en el número y en la capacidad de auto-renovación de las células madre presentes en los glioblastomas. Por lo tanto, y según la hipótesis sobre el papel que pueden desempeñar las células madre presentes en los tumores, C/EBP β contribuiría a un aumento en la malignidad y en la progresión del tumor.

1.7 Regulación del gen S100A4 por el factor de transcripción C/EBP β .

La proteína S100A4, conocida como *metastasin-1* (Mts1) de 12 KDa, pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a calcio S100 y se encuentra implicada en procesos de invasión y metástasis. Los datos obtenidos en el PCR-Array (apartado 1.3 de “Resultados”), diseñado para la identificación de genes implicados en el desarrollo tumoral, revelaron que cuando disminuíamos los niveles del factor de transcripción C/EBP β , la expresión del mRNA de S100A4 disminuía significativamente. El cociente entre los niveles de mRNA entre la línea interferida en C/EBP β (I4) y la línea control (C1) fue de 0,04 (ver Tabla 1). Dada la diferencia tan significativa en los niveles de mRNA de esta proteína entre ambas líneas celulares, decidimos a continuación analizar más en profundidad la regulación de S100A4 por C/EBP β . Para ello lo primero que hicimos fue confirmar la disminución en los niveles de mRNA por PCR cuantitativa. La Figura 12A, muestra los niveles de RNA mensajero de S100A4, normalizados por β -actina, y analizados por RT-PCR cuantitativa, en las líneas control (C1) e interferida en C/EBP β (I4). En esta figura se observa un descenso de 16 veces en los niveles de mRNA de S100A4 en la línea interferida en C/EBP β con relación al control. A continuación, analizamos si esta bajada en los niveles de mRNA también se correspondía con una disminución importante en los niveles de proteína. Como se muestra en la Figura 12B, los niveles de proteína S100A4 son prácticamente indetectables en las células I4, donde C/EBP β está interferida.

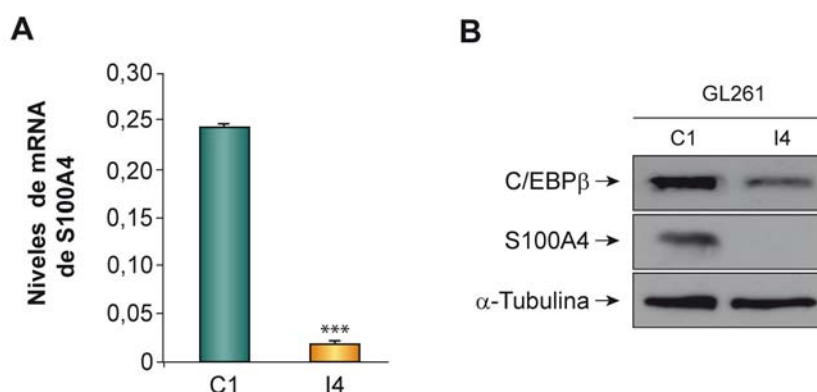


Figura 12. Efecto de C/EBP β sobre la expresión de S100A4. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de S100A4 en la línea control, C1 y en la línea interferida en C/EBP β , I4, mediante RT-PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman específicas para S100A4 y β -actina de ratón. Se muestran las medias de los valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de S100A4/ β -actina \pm DS. *** $p < 0,001$. (B) Análisis por Western Blot de los niveles de proteína de C/EBP β y S100A4 en las líneas C1 e I4. Imágenes representativas de 2 experimentos distintos.

Mediante análisis *in silico*, utilizando los programas *Ensembl*, para obtener la secuencia del promotor de S100A4 en ratón, y *TF Search* y *Mat Inspector*, para buscar los sitios de unión de C/EBP β en dicho promotor, detectamos que en la posición -606/-591 se encontraba un sitio de unión consenso para C/EBP β (Figura 13). Además de este sitio encontramos sitios de unión para otros factores de transcripción como CREB y AP-1, a los cuales se ha descrito que C/EBP β podría unirse como homodímero o formando heterodímeros con estas proteínas (Flammer et al., 2006; Hsu et al., 1994), modificando así su capacidad de transactivación.

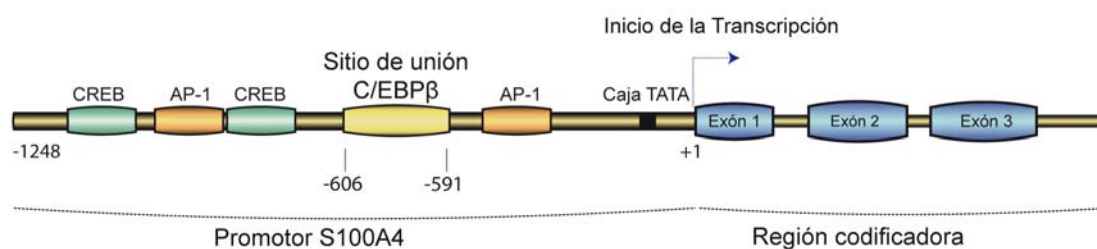


Figura 13. Esquema representativo de la región promotora y codificadora del gen S100A4 en ratón. El promotor contiene un sitio de unión para el factor de transcripción C/EBP β en la posición -606/-591 y varios sitios de unión para los factores CREB y AP-1, donde C/EBP β puede unirse como homodímero o formando heterodímeros con estas proteínas.

Para determinar si C/EBP β interacciona con el promotor de S100A4, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en este promotor (ver Materiales y Métodos). Para ello, utilizamos células GL261 y un anticuerpo específico contra C/EBP β para precipitar el inmuno-complejo formado por el DNA y este factor de transcripción. La Figura 14, muestra la amplificación mediante PCR de la zona del promotor de S100A4 que flanquea el sitio de unión a C/EBP β tanto en la cromatina total (Input) como en la secuencia inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-C/EBP β . Los resultados presentados en esta Figura demuestran que se produce una unión directa del factor de transcripción C/EBP β a la secuencia -606/-591 del promotor de S100A4.

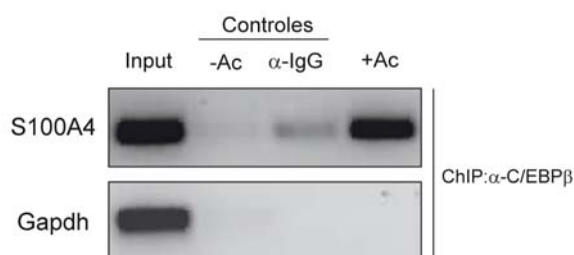


Figura 14. Ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con un anticuerpo anti-C/EBP β en células GL261. Se muestra la amplificación por PCR de la secuencia que contiene el sitio de unión a C/EBP β en el promotor de S100A4 de ratón (+Ac) y la amplificación del gen Gapdh como control de especificidad. Input: cromatina total -Ac: sin anticuerpo. α IgG: anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo. +Ac: anticuerpo específico anti-C/EBP β

A continuación, analizamos si C/EBP β estaba regulando la expresión del gen S100A4. Para ello, amplificamos por PCR un fragmento del promotor de S100A4 de 1515 pares de bases (-1248/+267) a partir de DNA genómico extraído de células GL261. Una vez amplificado dicho fragmento, lo clonamos en el plásmido pGL4.10 conteniendo el gen testigo de la luciferasa (pS100A4/1248) y transfectamos en células GL261 junto con un plásmido de sobreexpresión de C/EBP β (pcDNA3- C/EBP β). Analizamos la actividad del promotor 48 horas después de la cotransfección con ambas construcciones, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (Figura 15) muestran que la cotransfección con un plásmido que sobreexpresa C/EBP β induce 14 veces al promotor de S100A4, con respecto a los valores basales.

C/EBP β actúa como un factor de transcripción uniéndose a secuencias específicas del DNA (secuencia consenso: TTG/ACGC/TAA (Kfoury and Kapatos, 2009)). Como hemos comentado anteriormente encontramos dicha secuencia en la posición -609/-591 del promotor de S100A4. Por tanto, con el fin de comprobar si esta secuencia era responsable del efecto observado, generamos una construcción en la que deleccionamos parte de la zona 5' del promotor (pS100A4/298; secuencia -298/+267), incluyendo el sitio consenso de unión a C/EBP β . Estudios de transfección transitoria con dicha construcción mostraron una disminución significativa en la activación del promotor de S100A4 en respuesta a C/EBP β (Figura 15). Estos resultados indican que en la zona deleccionada se encuentran los elementos clave responsables de la activación de la expresión de S100A4 por C/EBP β .

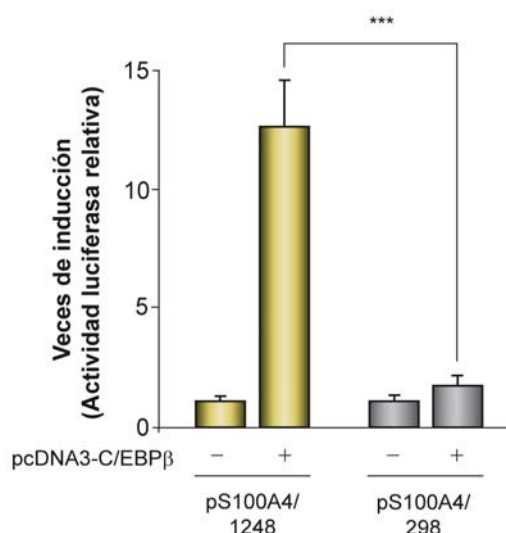


Figura 15. Ensayo de transfección transitoria en células GL261. Se muestra la actividad luciferasa utilizando las construcciones pS100A4/1248 y pS100A4/298, correspondientes al promotor completo de S100A4 y a la delección del sitio de unión de C/EBP β (respectivamente) en ausencia y presencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBP β . Los valores fueron corregidos con respecto a la actividad luciferasa en ausencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBP β . Se muestra el valor medio de las veces de inducción \pm DS de 3 experimentos distintos. ***p<0,001

Con el fin de comprobar más en detalle si la secuencia consenso de unión a C/EBP β localizada entre -606/-591 del promotor de S100A4 era la secuencia responsable del efecto

observado, realizamos estudios de mutagénesis dirigida. Para ello utilizamos cebadores específicos que contenían diferentes mutaciones (ver Tabla III, “Materiales y Métodos”) para analizar si estas mutaciones anulaban el efecto activador de C/EBP β sobre el promotor de S100A4. Como en estudios anteriores, llevamos a cabo transfecciones transitorias con estos mutantes y el plásmido de sobreexpresión de C/EBP β en las células GL261. Los resultados de actividad luciferasa mostraron una disminución de aproximadamente un 47% utilizando la construcción Mut 4c (pS100A4/Mut4c) con respecto a la construcción conteniendo este promotor sin mutar (pS100A4/1248) (Figura 16). Estos resultados sugieren que, aunque C/EBP β efectivamente se une al sitio -606/-591 (según hemos observado por los análisis de inmunoprecipitación de cromatina), este sitio no es el único responsable de la regulación de S100A4. Este hecho podría deberse a que esta regulación podría estar también mediada por la unión de C/EBP β a los sitios de unión de los factores de transcripción CREB o AP-1, los cuales también encuentran ausentes en la construcción delecionada pS100A4/298.

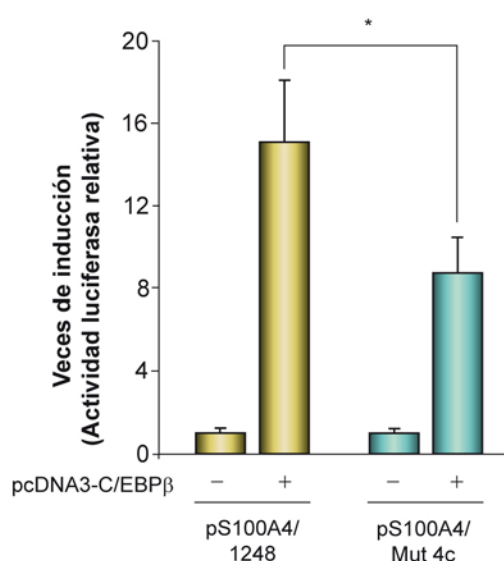


Figura 16. Ensayo de transfección transitoria en células GL261. Se muestra la actividad luciferasa utilizando las construcciones pS100A4/1248 y pS100A4/Mut4c, correspondientes al promotor completo de S100A4 y a la mutación completa del sitio unión de C/EBP β (respectivamente) en ausencia y presencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBP β . Los valores fueron corregidos con respecto a la actividad luciferasa en ausencia del plásmido de sobreexpresión pcDNA3-C/EBP β . Se muestra el valor medio de las veces de inducción \pm DS de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$

2. GSK-3 β como posible nueva diana en el tratamiento de glioblastomas.

Glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), es una de las dos isoformas de la serina/treonina quinasa GSK-3. Se identificó inicialmente como una proteína quinasa que fosforila e inactiva la glucógeno sintasa, la enzima involucrada en la biosíntesis del glucógeno (Embi et al., 1980). Más recientemente se sabe que GSK-3 es un componente esencial en múltiples funciones celulares incluyendo estructura celular, metabolismo,

proliferación, supervivencia y tumorigénesis (rev. (Jope and Johnson, 2004)). Sin embargo, no hay prácticamente datos en la literatura sobre su posible papel en el desarrollo de glioblastomas. En este sentido, y siguiendo el objetivo de la identificación de nuevas dianas para el tratamiento de glioblastomas, hemos analizado el papel de esta enzima en la proliferación y muerte celular de células de glioblastoma, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando un inhibidor de GSK-3 β conocido como TDZD-8. TDZD-8 pertenece a la familia de las tiadiazolidinonas (TDZDs) cuyos miembros están descritos como inhibidores específicos de GSK-3 β no competitivos con ATP, uniéndose directamente al sitio catalítico de esta enzima (Martinez et al., 2002).

2.1 TDZD-8 disminuye la proliferación y viabilidad celular *in vitro* de células de glioblastoma de ratón y humano.

El primer objetivo de esta parte del trabajo fue determinar el efecto del compuesto TDZD-8 sobre la línea celular de glioblastoma de ratón GL261. Para ello realizamos estudios de viabilidad celular. En la [Figura 17](#), se muestran los resultados de un estudio de dosis-respuesta a este compuesto mediante ensayos de MTT incubando las células GL261 durante 48 horas con varias concentraciones de TDZD-8. Los resultados obtenidos muestran que TDZD-8 reduce la viabilidad de las células GL261, obteniéndose que la dosis de 20 μ M, es la dosis más efectiva de TDZD-8 que causa una muerte superior al 50% y por tanto es la dosis que hemos utilizado en los estudios posteriores.

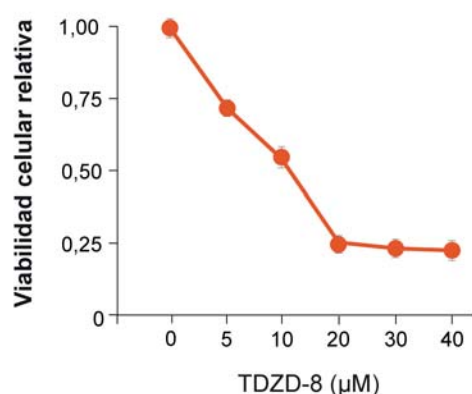


Figura 17. Análisis de viabilidad. Las células de glioblastoma GL261 fueron tratadas con TDZD-8 durante 48 horas a las concentraciones indicadas y la viabilidad fue medida mediante ensayos de MTT. Los valores representan el valor medio \pm DS de 3 experimentos distintos.

Analizamos también la viabilidad celular a diferentes tiempos desde la adición al medio de incubación de TDZD-8 en tres líneas celulares, GL261 (ratón) y, A172 y U373 (humanas), mediante ensayos de MTT. La [Figura 18](#) muestra que el tratamiento con

TDZD-8 (20 μ M) disminuyó la viabilidad de las tres líneas testadas a todos los tiempos analizados con respecto al control.

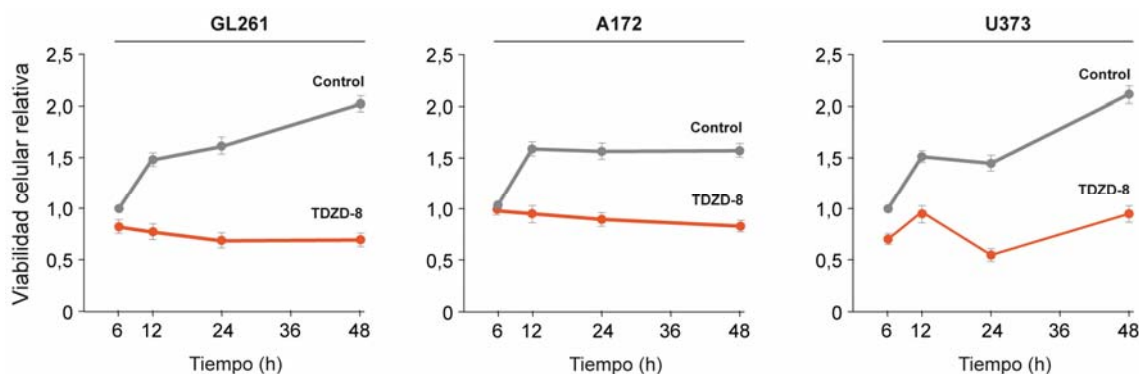


Figura 18. TDZD-8 disminuye la supervivencia en diferentes líneas de glioblastoma. Las líneas GL261, A172 y U373 fueron sembradas en placas de 96 pocillos y cultivadas a distintos tiempos en ausencia y en presencia de TDZD-8 (20 μ M). A continuación, se determinó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se indica el valor medio \pm DS de 3 experimentos diferentes.

A continuación, decidimos determinar el efecto de TDZD-8 sobre la proliferación celular utilizando ensayos colorimétricos de ELISA midiendo incorporación de BrdU. Las células GL261 creciendo exponencialmente se trataron con TDZD-8 (20 μ M) durante 24 y 48 horas para analizar su proliferación en las condiciones indicadas. Observamos una disminución significativa en las células tratadas con este compuesto, en comparación con las células controles no tratadas (Figura 19). Este efecto anti-proliferativo sobre células de glioblastoma de ratón GL261 se confirmó en las otras dos líneas celulares humanas: A172 y U373 (Figura 19)

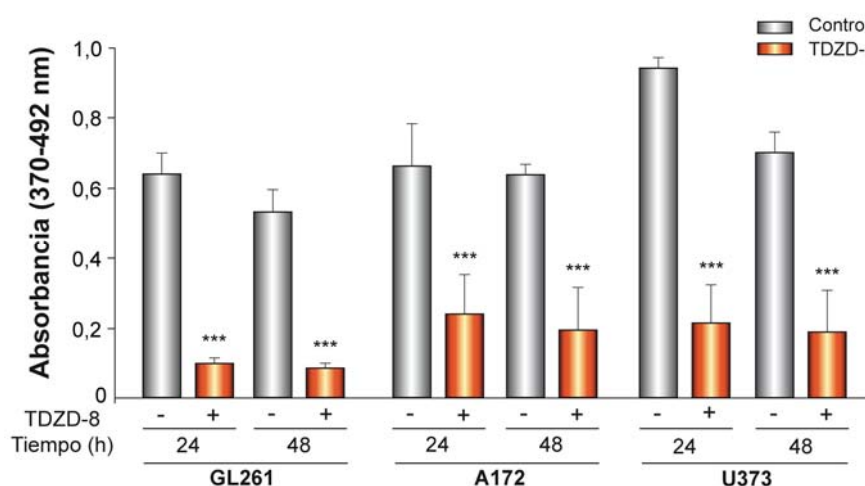


Figura 19. Efecto antiproliferativo de TDZD-8 en diferentes líneas de glioblastoma. Las líneas GL261, A172 y U373 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos durante 24 y 48 horas en ausencia y en presencia de TDZD-8 (20 μ M), durante este tiempo se añadió BrdU (10 μ g/ml) al medio de cultivo (pulso de BrdU de 16 horas). Se indica el valor medio \pm DS de 3 experimentos diferentes. ***p<0,001.

Posteriormente estudiamos la capacidad de TDZD-8 de inducir apoptosis en células GL261, A172 y U373 mediante tinción con anticuerpos específicos anti-caspasa 3-activa y también por análisis de TUNEL (Figura 20).

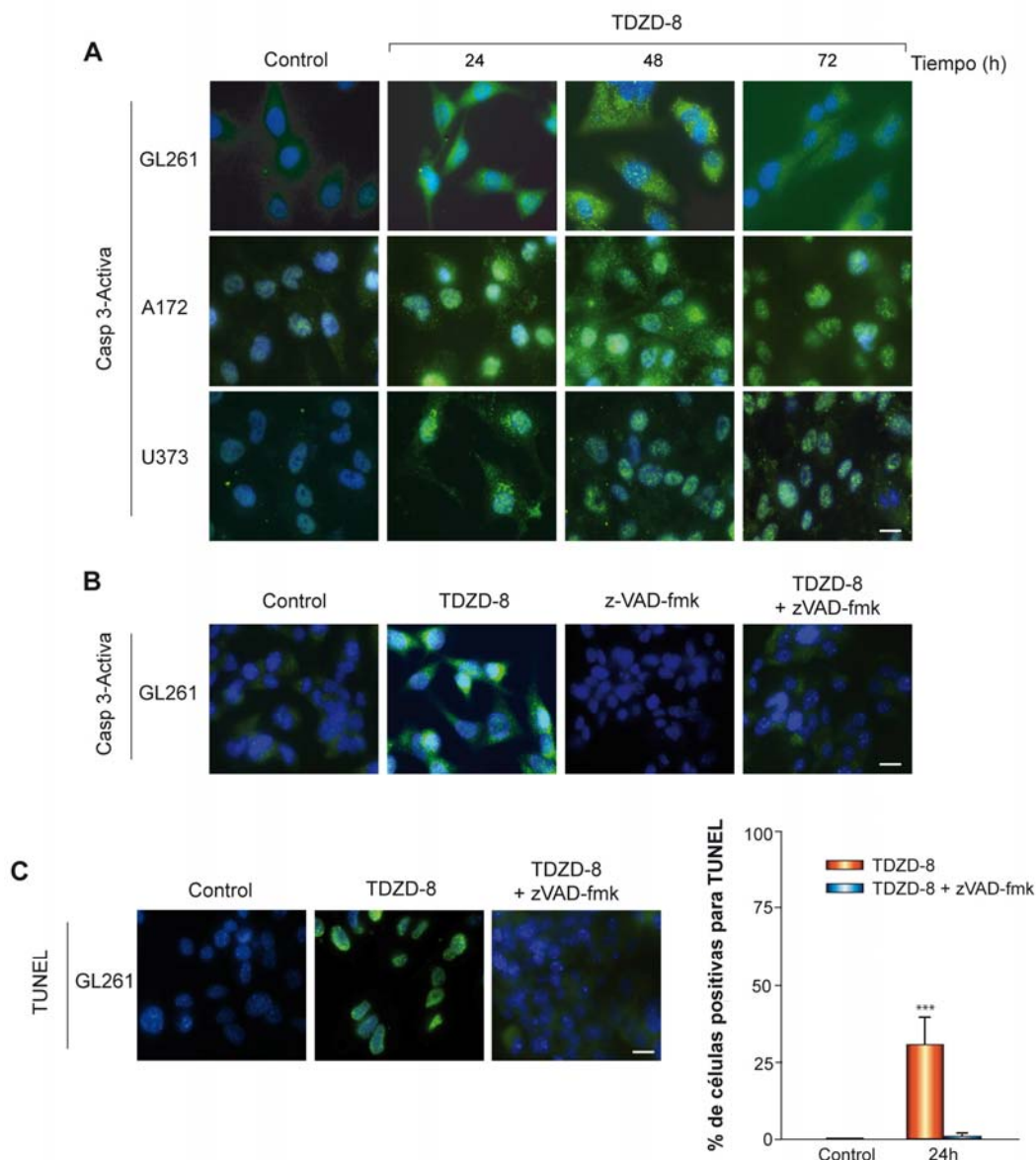


Figura 20. Efecto del tratamiento con TDZD-8 en la apoptosis. (A) Diferentes líneas de glioblastoma fueron crecidas en cubreobjetos y tratadas con TDZD-8 (20 µM) a 24, 48 y 72 horas. La apoptosis fue analizada mediante inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo específico anti-Caspasa 3-Activa. Se muestran imágenes representativas. Barra de escala 25 µm. (B) Las células GL261 fueron crecidas en cubreobjetos y tratadas durante 24 horas con TDZD-8 y con TDZD-8 + zVAD-fmk (inhibidor general de caspasas), la muerte celular fue analizada mediante inmunofluorescencias utilizando el anticuerpo específico anti-Caspasa 3-Activa. Barra de escala 25 µm. (C) Se muestran imágenes representativas de células GL261 crecidas en cubreobjetos y tratadas 24 horas con TDZD-8 o con TDZD-8 + zVAD-fmk, realizando posteriormente un análisis de la apoptosis mediante TUNEL. Barra de escala 25 µm. La gráfica muestra la cuantificación de las células positivas para TUNEL 24 horas después del tratamiento con TDZD-8 y TDZD-8 + zVAD-fmk. Se muestra el valor medio ± DS de 10 campos aleatorios de 3 experimentos distintos.

El tratamiento de las células GL261, A172 y U373 con TDZD-8 a 24, 48 y 72 horas, resultó en un aumento significativo en el número de células teñidas con anti-caspasa 3-activa (Figura 20A). Este incremento en el número de células positivas para caspasa 3-activa fue totalmente anulado tras el tratamiento de los cultivos con el inhibidor universal de caspasas *N-benzoylcarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro methylketone* (zVADfmk) (Figura 20B). La inducción de apoptosis por TDZD-8 en las células de glioblastoma fue corroborado mediante ensayos de TUNEL en las células GL261 (Figura 20C). El tratamiento de estos cultivos con TDZD-8 produjo un aumento en el número de células marcadas, el cual fue de nuevo inhibido tras la incubación de las células con zVADfmk (Figura 20C). Estos resultados, junto con los presentados en las Figuras 17, 18 y 19, indican que el tratamiento de células de glioblastoma, tanto murinas como humanas, con TDZD-8 induce una parada del crecimiento como consecuencia de una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis.

2.2 Estudio del mecanismo de acción implicado en los efectos de TDZD-8 en células de glioblastoma.

Aunque TDZD-8 se describió inicialmente como un inhibidor ATP-no competitivo de GSK-3 β , Guzman y Cols. y trabajos no publicados del laboratorio indican que podría actuar a través de otras vías de señalización. Por tanto, analizamos más en profundidad el mecanismo de acción de este compuesto responsable de los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos en células de glioblastoma. Para ello, estudiamos la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y en especial la proteína quinasa regulada por señales extracelulares ERK1/2, cuya activación se ha relacionado con una disminución de la supervivencia celular en distintas líneas tumorales incluyendo líneas de glioblastoma (Goulet et al., 2005; Tang et al., 2002; Tewari et al., 2008). Para ello analizamos el estado de fosforilación de ERK1/2, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos (Figura 21) Los resultados obtenidos muestran que la proteína ERK1/2 es rápidamente fosforilada tras el tratamiento con TDZD-8 (panel izquierdo); quince minutos después del tratamiento de células GL261 con TDZD-8 observamos una fuerte inducción en la fosforilación de ERK1/2, la cual iba desapareciendo con el tiempo. Observamos también que después de este primer pico de fosforilación se producía otro a las 24 horas del tratamiento con este compuesto (panel derecho). Posteriormente estudiamos la expresión de dos genes diana de la ruta de ERK1/2 que se sabe están implicados en

procesos de crecimiento celular como son el gen de respuesta temprana EGR-1 y p21 (Choi et al., 2008). En el panel izquierdo de la [Figura 21](#) se puede observar un aumento en la expresión de ambos genes, una y dos horas después del tratamiento con TDZD-8 y posterior a la fosforilación de ERK1/2.

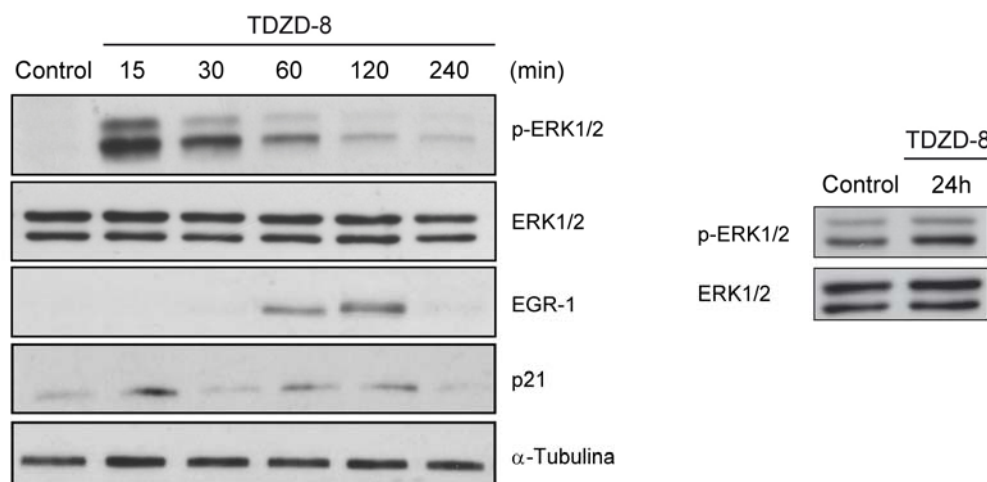


Figura 21. Vías de señalización inducidas por TDZD-8. Las células GL261 fueron tratadas con TDZD-8 (20 μ M) a diferentes tiempos y a continuación se analizó la fosforilación y/o expresión de distintos genes implicados en la ruta de señalización de las MAPK a los tiempos indicados. Se muestran imágenes representativas de dos ensayos diferentes.

Analizamos también la posible activación de la quinasa ribosomal S6 (p90RSK), la cual se sabe que es también un gen diana de ERK1/2, a través de su fosforilación en Ser380 (Roux et al., 2003; Wang et al., 2003) y que a su vez es capaz de fosforilar e inactivar GSK-3 β mediante su fosforilación en Ser9 (Das et al., 2010; Saito et al., 1994). Al analizar el estado de fosforilación de ambas enzimas mediante anticuerpos específicos tras el tratamiento con TDZD-8, observamos que tanto la Ser380 de p90RSK como la Ser9 de GSK-3 β se encontraban fosforiladas ([Figura 22](#)). Aunque el aumento en la fosforilación de ERK1/2 a 24 horas no es tan elevado como el observado a tiempos cortos ([Figura 21](#)) este aumento es suficiente para iniciar la cascada de señalización que conduce a la activación de su diana p90-RSK, con la consiguiente fosforilación e inactivación de GSK-3 β . Para demostrar que la ruta ERK1/2/p90-RSK es la responsable de fosforilar a GSK-3 β tras el tratamiento con TDZD-8, utilizamos el inhibidor PD98059 que es un inhibidor específico de esta ruta. Nuestros resultados mostraron que la adición de PD98059 inhibe la fosforilación de GSK-3 β en Ser9, sugiriendo por tanto que la ruta de las MAPK juega un papel relevante en la fosforilación y consecuente inactivación de esta enzima.

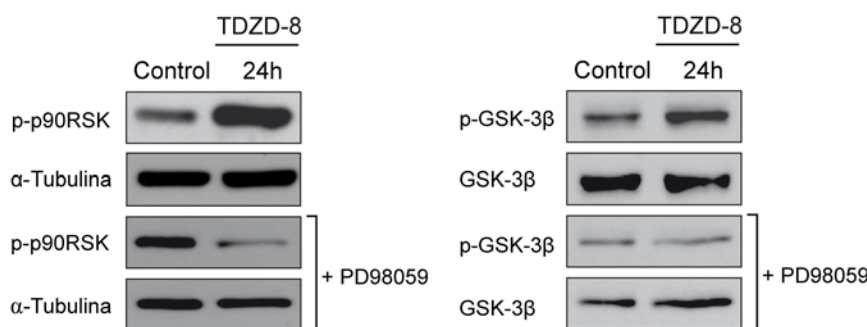


Figura 22. Vías de señalización inducidas por TDZD-8. Células GL261 fueron tratadas con TDZD-8 (20μM) durante 24 horas en presencia o ausencia del inhibidor de la ruta de las MAPK, PD98059 (80μM), una hora antes del tratamiento con TDZD-8. Se analizaron los niveles de fosforilación de p-90RSK y GSK-3β. Se muestran imágenes representativas de dos ensayos diferentes.

Trabajos anteriores han descrito que GSK-3β es capaz de regular la supervivencia de las células tumorales a través de la ruta de NF-κB (Kotliarova et al., 2008) y que esta regulación se produce a nivel transcripcional (Hoeflich et al., 2000). Teniendo esto en cuenta analizamos como afectaría la inhibición de GSK-3β, inducida por TDZD-8, a la actividad transcripcional de NF-κB en las células de glioblastoma de ratón GL261. Para ello, realizamos transfecciones transitorias utilizando un plásmido reportero que contiene el gen testigo de la luciferasa (Luc) bajo el control de tres copias consenso del elemento respuesta a NF-κB (3xKBtk-Luc) en posición 5' al promotor mínimo del gen de la timidina kinasa (tk), tanto en células tratadas con TDZD-8 como en células no tratadas. En la [Figura 23](#), se muestra como el tratamiento con TDZD-8 disminuye significativamente la actividad de NF-κB, lo cual está de acuerdo con datos ya publicados en otras situaciones como en casos de isquemia en miocardio y cerebro (Collino et al., 2009 ; Gao et al., 2008).

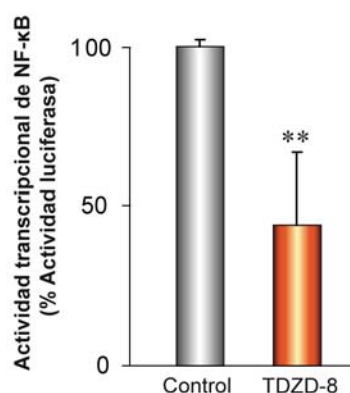


Figura 23. Ensayo de transactivación para NF-κB. Las células GL261 fueron transfectadas con el plásmido reportero 3xKBtk-Luc durante 48 horas en ausencia y presencia de TDZD-8, a continuación se midió la actividad luciferasa. Se representa el valor medio normalizado \pm DS, de tres experimentos distintos.

2.3 Efecto de TDZD-8 sobre la actividad transcripcional del receptor activado por proliferadores peroxisomales PPAR γ y su implicación en la supervivencia de las células de glioblastoma GL261

Como ya hemos comentado anteriormente, datos preliminares de nuestro grupo indican que TDZD-8, aparte de sus efectos ya descritos sobre GSK-3 β y la ruta de señalización de las MAPK, puede actuar a través de diferentes vías de señalización, entre las que se encontrarían un posible efecto sobre PPAR γ . El receptor activado por proliferadores peroxisomales- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* , PPAR γ) es un factor de transcripción inducido por ligando, que pertenece a la superfamilia de los receptores de hormonas nucleares (Evans, 1988). PPAR γ activa la transcripción de sus genes diana a través de su heterodimerización con el receptor de retinoides X (RXR) y su unión a secuencias consenso denominadas PPRE en el promotor de dichos genes. La activación de PPAR γ por diferentes ligandos está implicada en la regulación de numerosos procesos celulares como proliferación y diferenciación, metabolismo y también en procesos tumorales (Grommes et al., 2004; Tontonoz et al., 1994). Se sabe que, en general, ligandos de PPAR γ reducen la proliferación de numerosas células tumorales, incluyendo células de glioma (Grommes et al., 2006). Resultados previos del laboratorio han demostrado que diferentes miembros de la familia de las TDZDs, además de inhibidores de GSK-3 son también agonistas de PPAR γ (Luna-Medina et al., 2005; Luna-Medina et al., 2007). Esto, junto con el hecho comentado anteriormente de que la activación de este receptor resulta en una inhibición de la proliferación y una inducción de apoptosis en glioblastomas (Grommes et al., 2006), nos llevó a analizar más en profundidad si TDZD-8 era capaz de activar transcripcionalmente a PPAR γ y por tanto esta activación podría también jugar un papel en sus efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos. Para ello, realizamos transfecciones transitorias en células GL261 con el plásmido reportero pPPRE-tk-Luc que contiene el gen testigo luciferasa y tres copias del elemento respuesta a PPAR γ (PPRE) en posición 5' al promotor mínimo del gen de la timidina kinasa (tk). Las células fueron tratadas durante 48 horas con TDZD-8 y con 15-deoxi- Δ^{12-14} -Protaglandina J₂, un ligando conocido de este receptor (15d-PDJ₂) como control positivo de la activación transcripcional de PPAR γ descrito como un agonista activador de PPAR γ con propiedades anti-neoplásicas (Grommes et al., 2004). La [Figura 24](#), muestra como TDZD-8 es capaz de activar transcripcionalmente a PPAR γ , obteniéndose un nivel de activación similar al observado con 15d-PDJ₂. Estos datos sugieren que TDZD-8 podría ser un nuevo ligando de

este receptor y que sus efectos anti-proliferativos en células de glioblastoma podrían, también en parte estar mediados por su efecto activador de PPAR γ .

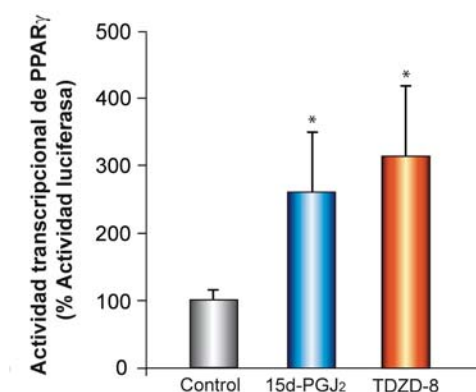


Figura 24. Ensayo de transfección transitoria. Células GL261 fueron transfectadas con el plásmido reportero pPPRE-tk-Luc y tratadas durante 48 horas en ausencia y presencia de TDZD-8 (20 μ M) o con 15-deoxi- Δ^{12-14} -Prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂, 10 μ M) como control positivo. A continuación, se midió la actividad luciferasa. Se representa el valor medio normalizado \pm DS, de tres experimentos distintos.

Publicaciones previas del laboratorio han demostrado que la activación de PPAR γ por ligandos como 15d-PGJ₂ inducen la expresión del gen supresor de tumores BRCA1 en células de cáncer de mama, y que esta regulación tiene lugar a través de una regulación directa de su promotor (Pignatelli et al., 2003). BRCA1 es un gen cuya expresión también se ha asociado a la inhibición del desarrollo de gliomas (Bencokova et al., 2008). En base a estos datos decidimos analizar si TDZD-8 al comportarse como un ligando de PPAR γ en células de glioblastoma podría también estar regulando la expresión de BRCA1 en estas células. Para analizar esto, células GL261 se incubaron durante 24 y 48 horas con TDZD-8 y se estudiaron los niveles de proteína BRCA1 y también de su gen diana p53 (Chai et al., 1999) que controla la expresión del inhibidor de kinasas dependiente de ciclina p21. La **Figura 25A** muestra que las células tratadas con TDZD-8 presentan un aumento significativo en la expresión tanto de BRCA1 como de p53. De acuerdo con el aumento en p53 observamos un aumento de otra diana de esta proteína como es p21. BRCA1 es capaz de promover apoptosis e inhibir proliferación a través de varios mecanismos. Entre estos se incluye la degradación de la forma activada de la proteína serín/treonín AKT (p-AKT, fosforilada en el Ser473) mediante su unión a esta forma activa y su subsecuente degradación mediante ubiquitinación (Xiang et al., 2008). En este sentido observamos también que la proteína AKT (**Figura 25B**) se encuentra constitutivamente activa en células GL261 y que el tratamiento con TDZD-8 durante 48 horas reduce sus niveles de fosforilación, asociado al aumento de expresión de BRCA1.

Todos estos datos en conjunto sugieren que la activación del receptor nuclear PPAR γ por TDZD-8 podría conducir a un aumento en los niveles de BRCA1 que activaría por un

lado la expresión de p53 y por otro inhibiría en parte la ruta de señalización de PI-3K, a través de la degradación de p-AKT por el proteasoma, y por tanto podría contribuir a la disminución en la viabilidad de células de glioblastoma inducida por TDZD-8.

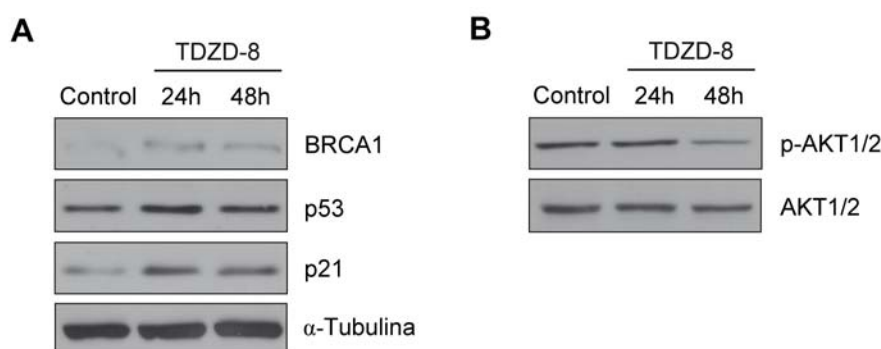


Figura 25. Niveles de expresión de las proteínas BRCA1, p53, p21 y p-AKT. Células GL261 se trataron con TDZD-8 (20μM) durante 24 y 48 horas. (A) Western blot representativo de los genes supresores de tumores BRCA1 y p53, y del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina p21. (B) Western blot representativo de los niveles de p-AKT

2.4 Efecto de TDZD-8 sobre la formación y auto-renovación de las células madre del glioblastoma *in vitro*

El modelo de las células madre del cáncer, como ya hemos comentado anteriormente (apartado 1.5 de Resultados), sugiere que son una subpoblación de células con las mismas características que las células madre normales, pero que serían en parte responsables del mantenimiento y progresión del tumor. Por tanto, analizamos si el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de TDZD-8 observado en las líneas celulares adherentes, ocurría también en células madre derivadas de glioblastoma de ratón (NSFG). Para ello, lo primero que estudiamos fue la expresión de dos marcadores de células madre: Musashi-1 y Oct-4, tanto en las células GL261 adherentes como en las NSFG aisladas partir de estas células (Figura 26A). No detectamos expresión de Musashi-1 ni de Oct-4 en células GL261 adherentes, sin embargo sí observamos que ambas proteínas se expresaban en las NSFG, indicando que estos cultivos están en efecto enriquecidos en células madre.

Es conocido que la proteína IV de los filamentos intermedios, Nestina, puede ser utilizada como marcador de células madre neurales normales y precursores neurales o células madre del glioblastoma (Singh et al., 2004a; Taylor et al., 2005), por lo que a continuación analizamos si TDZD-8 podría afectar a la expresión de este marcador en la población de las células madre en la línea de glioblastoma GL261. La Figura 26B, muestra que los cultivos de células GL261 adherentes tratados con TDZD-8 a 24 y 48 horas,

muestran una disminución significativa en los niveles de Nestina, lo que sugeriría una disminución en la población de NSFG inducida por este compuesto.

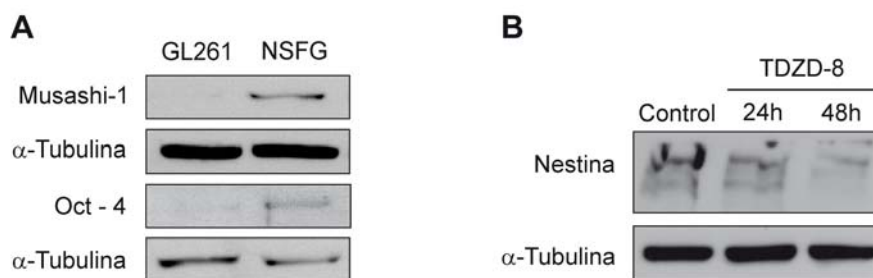


Figura 26. Análisis de marcadores de células madre neurales. (A) Western blot representativo de la expresión de los marcadores de células madre Musashi-1 y Oct-4 en células adherentes GL261 y NSFG procedentes de dicha línea celular. (B) Células GL261 adherentes fueron tratadas con TDZD-8 (20 μ M) durante 24 y 48 horas. Se determinaron los niveles de proteína del marcador de células madre neurales, Nestina. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos distintos.

A continuación, estudiamos si en efecto TDZD-8 podría reducir la subpoblación de células madre presentes en los cultivos de células GL261. Para ello analizamos su efecto sobre el crecimiento de estas células cultivadas en condiciones de NSFG.

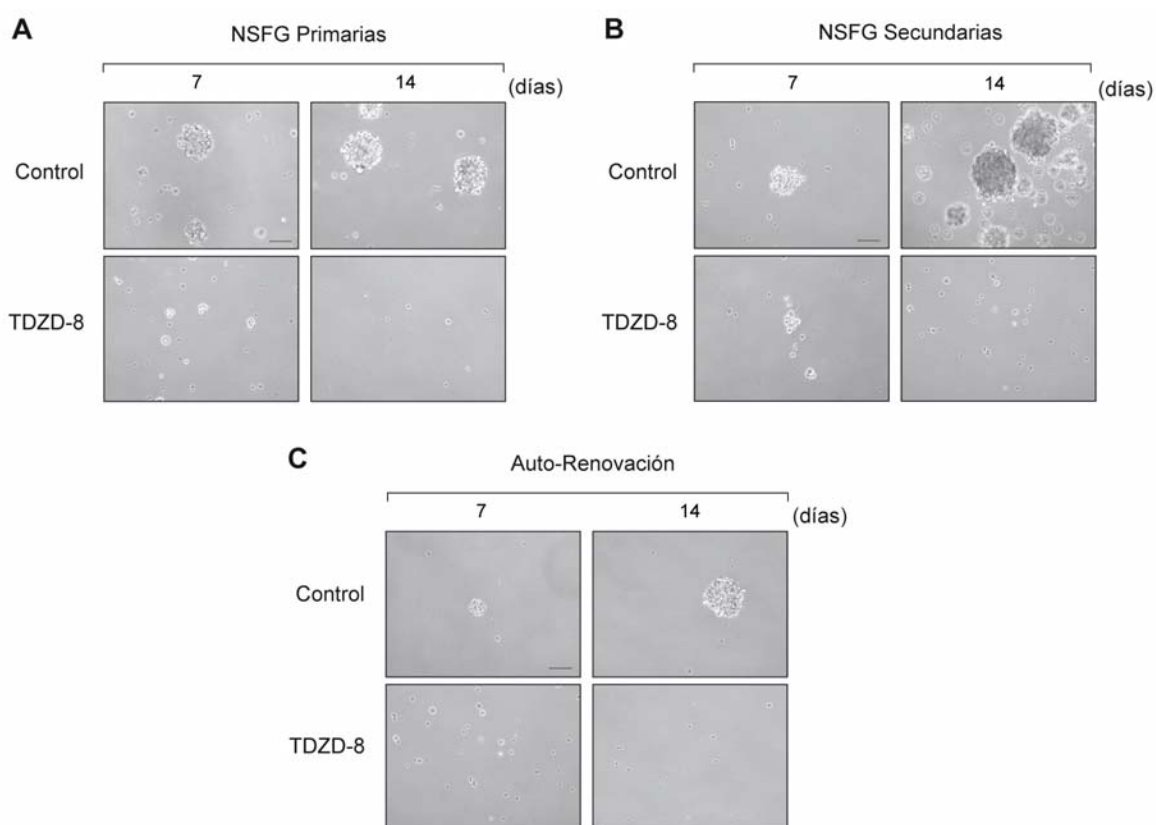


Figura 27. Efecto de TDZD-8 en la formación de neuroesferas a partir de células GL261 (NSFG). Las NSFG fueron sembradas y crecidas en medio Ham's-F12/DMEM sin suero, suplementado con B27 y factores de crecimiento (20 ng/ml de EGF y FGF). (A) Imágenes representativas de NSFG primarias tratadas o no con TDZD-8 (10 μ M) durante 7 y 14 días. (B) Las NSFG primarias fueron disgregadas y crecidas en presencia de TDZD-8 (10 μ M) durante 7 y 14 días. Las imágenes muestran como TDZD-8 bloquea la formación de NSFG secundarias. (C) El tratamiento con TDZD-8 durante 7 y 14 días, elimina la capacidad de auto-renovación de las NSFG tras 7 y 14 días en cultivo. Barra de escala 100 μ m.

La [Figura 27A](#), muestra como TDZD-8 es capaz de inhibir la formación de neuroesferas generadas a partir de células GL261. En esta figura se muestra que después de cultivar las células, 7 y 14 días en presencia de TDZD-8, el número de NSFG primarias formadas y el volumen de éstas, es significativamente menor en comparación con células no tratadas con este compuesto. Asimismo, para determinar la capacidad de formación de nuevas neuroesferas, las NSFG primarias sin tratar con TDZD-8 fueron disgregadas y plaqueadas en igual número en medio adecuado para el crecimiento de NSFG secundarias. Aquellos cultivos tratados con TDZD-8 presentaron un bloqueo casi total en la formación de NSFG secundarias ([Figura 27B](#)). Finalmente para analizar el efecto de TDZD-8 en la capacidad de auto-renovación de las NSFG en el cultivo, disociamos las NSFG primarias crecidas en ausencia de TDZD-8 y las plaqueamos a muy baja densidad. A continuación, analizamos la formación de NSFG después de 7 y 14 días de tratamiento con TDZD-8 (20 μ M). Los resultados mostrados en la [Figura 27C](#) indican que el tratamiento con TDZD-8 inhibe la formación de neuroesferas en estas condiciones y por tanto sugieren que TDZD-8 bloquea también la capacidad de auto-renovación de las NSFG.

2.5 El tratamiento con TDZD-8 retrasa el desarrollo del glioblastoma *in vivo*

Finalmente, y basándonos en los resultados obtenidos *in vitro*, decidimos analizar el efecto de TDZD-8 en el crecimiento de glioblastomas *in vivo*. Para ello, inyectamos ortotópicamente la línea celular GL261 en el cerebro de ratones adultos. Tal y como se comenta en el apartado 1.4 de “Resultados”, el modelo de glioma de ratón generado por células GL261 es el más utilizado para estudios de generación de gliomas intracraneales, ya que estos gliomas presentan características anatomopatológicas similares a un glioblastoma humano. Los ratones inyectados intracranealmente con células GL261 fueron monitorizados mediante imágenes de resonancia magnética a diferentes tiempos después de la implantación.

Aquellos animales tratados con TDZD-8 (5 mg/Kg) diariamente (comenzando el tratamiento un día después de la implantación), presentaron un retraso en la aparición y progresión del tumor, en comparación con los animales control ([Figura 28A, B](#)). El análisis de las imágenes pesadas en T1 tras la administración del agente de contraste gadolinio-DPTA, reveló que los ratones tratados diariamente con TDZD-8 presentaron un volumen del tumor significativamente menor al presentado por los animales control ([Figura 28A](#)). Además, puede observarse que 13 días después de la inyección intracraneal aparece una

disminución significativa de aproximadamente un 84% en el volumen del tumor de los animales tratados con TDZD-8 (Figura 28C). Esta disminución, debida al tratamiento con TDZD-8, también puede apreciarse a los 20 días después de la inyección. La Figura 28D, muestra los análisis de supervivencia mediante análisis de Kaplan-Meier y su significancia estadística se analizó por el Log-Rank test. Los resultados obtenidos muestran que aquellos animales que habían sido tratados con TDZD-8 presentaban una supervivencia significativamente mayor ($p=0,006$), en comparación con los animales control no tratados (40 *versus* 30 días, respectivamente).

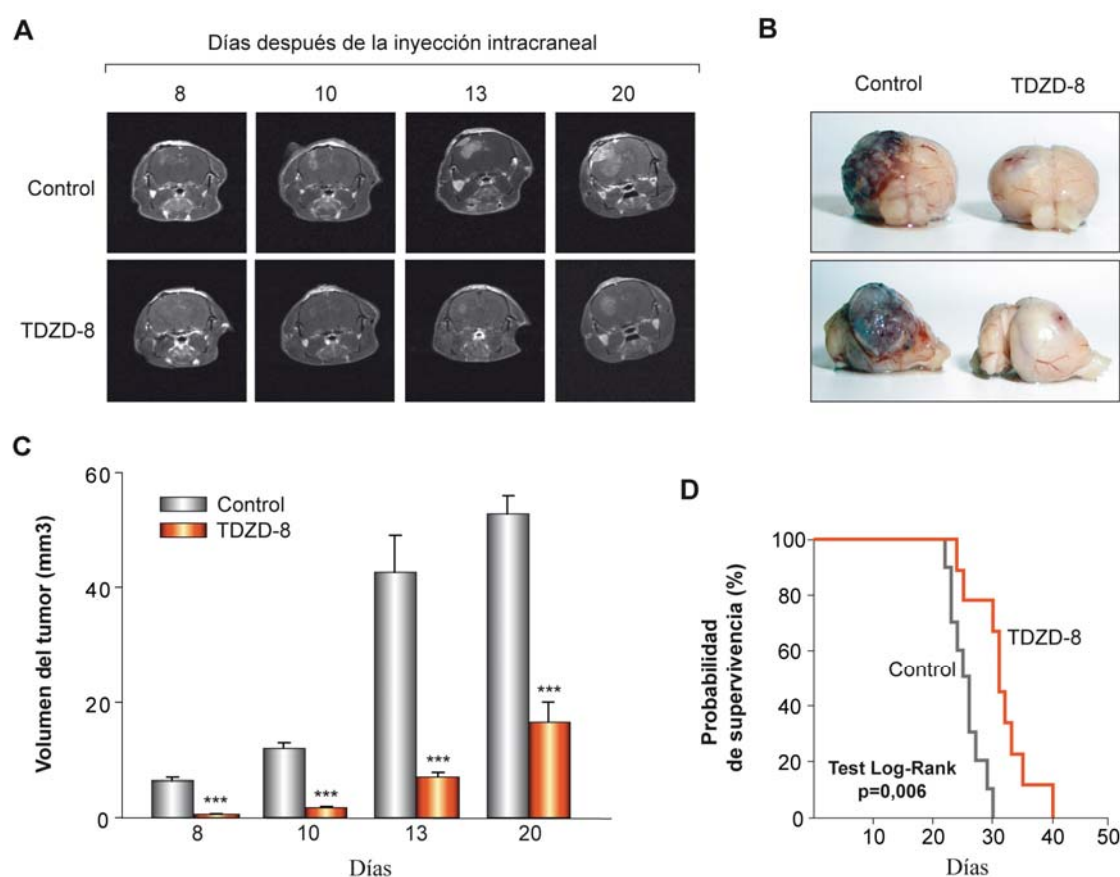


Figura 28. Efecto del tratamiento con TDZD-8 en el crecimiento de glioblastomas *in vivo*. (A) Imágenes representativas de RMN a 8, 10, 12 y 20 días después de la inyección intracraneal de 125.000 células de la línea GL261 en el hemisferio izquierdo de ratones adultos no tratados y tratados diariamente con 5mg/kg de TDZD-8. Las imágenes pesadas en T1 se obtuvieron con un escáner de 7 Telas como se describe en Materiales y Métodos. (B) Imágenes representativas de los tumores generados por las células GL261, 24 días después de su implantación intracraneal. (C) Análisis cuantitativo del volumen total del tumor a diferentes tiempos después de la implantación. Los valores representan el valor medio \pm DS de 10 animales diferentes. *** $p<0,001$ (D) La curva de supervivencia de Kaplan-Meier y el análisis estadístico de supervivencia global (test Log-Rank) demuestran que el tratamiento con TDZD-8 aumenta significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con sus controles no tratados (test Log-Rank $p=0,0012$). La supervivencia media de los ratones tratados con TDZD-8 fue de 40 días y de 30 días para los ratones no tratados.

A continuación, analizamos el efecto del tratamiento con TDZD-8 una vez que el tumor ya se había formado, en concreto en las etapas iniciales del desarrollo del glioblastoma, cuando empezábamos a detectar el tumor en las imágenes de resonancia magnética. Para ello, implantamos ortotópicamente las células GL261 y monitorizamos el desarrollo del tumor por RMN, comenzando el tratamiento con TDZD-8, al sexto día después de la implantación, cuando el tumor era ya visible. En la [Figura 29](#), se muestra que los animales tratados diariamente a partir del sexto día con 5 mg/Kg de TDZD-8, presentan también una disminución notable en el volumen del tumor desarrollado en comparación con los ratones control. Estos resultados son interesantes ya que indican que el compuesto TDZD-8 es efectivo reduciendo el tamaño del tumor no sólo cuando el tratamiento comienza casi simultáneamente con la implantación de las células, si no que también es efectivo una vez desarrollado el tumor.

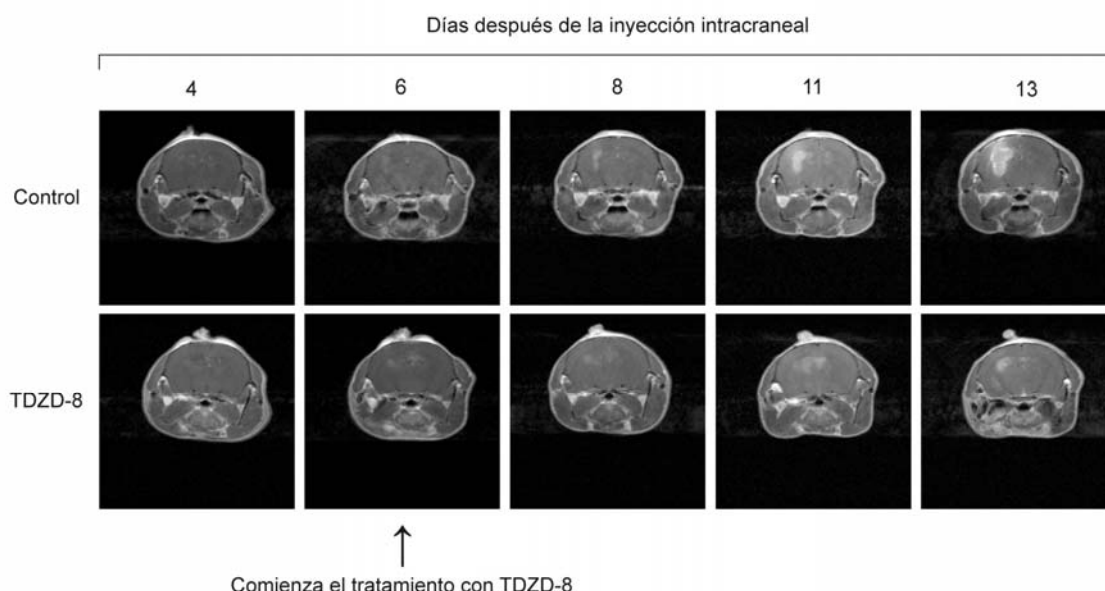


Figura 29. Efecto del tratamiento con TDZD-8 después de que el tumor se haya formado. Se muestran imágenes representativas de RMN a 4, 6, 8, 11 y 12 días después de la inyección intracraneal de 125.000 células de la línea GL261 en el hemisferio izquierdo de ratones adultos no tratados y tratados diariamente a partir del sexto día con 5 mg/Kg de TDZD-8. Las imágenes pesadas en T1 se obtuvieron con un escáner de 7 Teslas.

Tras los resultados obtenidos mediante resonancia magnética, decidimos realizar un análisis histológico de los glioblastomas generados a 12 y 24 días después de la inyección. La [Figura 30](#), muestra una tinción con hematoxilina-eosina de cortes del tumor generado, donde puede observarse que tanto los animales tratados como los no tratados desarrollaron glioblastomas de Grado IV debido sus características histopatológicas. Sin embargo, los animales controles en comparación con los animales tratados con TDZD-8, presentaron un

mayor número de células pleomórficas y multinucleadas (Figura 30, asteriscos), gran cantidad de matrices mixoides (Figura 30, flechas) y un mayor índice mitótico por campo observado (Figura 30, cabezas de flecha), todas ellas características típicas de un glioblastoma de alto grado humano.

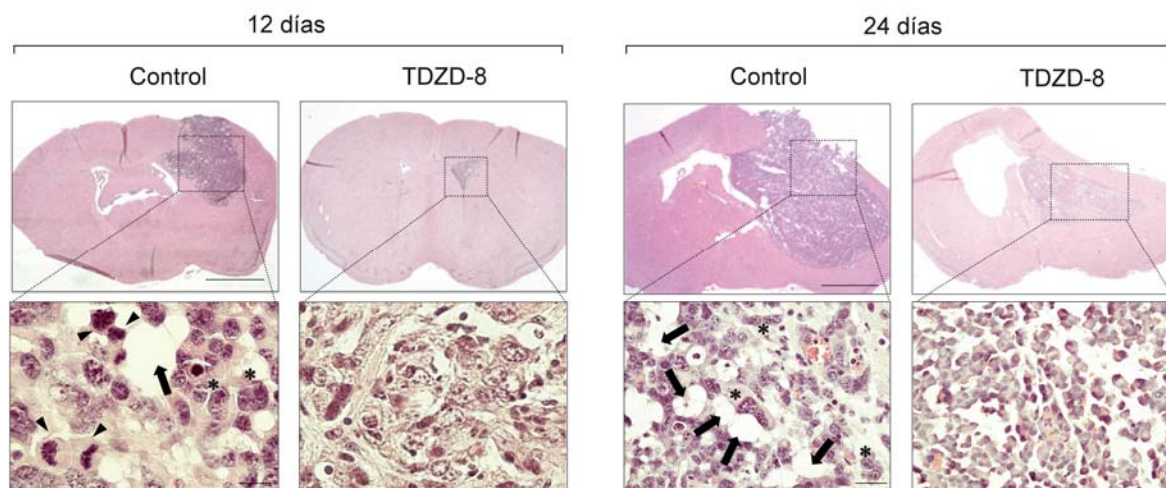


Figura 30. Análisis histológico de los glioblastomas generados por la inyección de las células GL261. Imágenes representativas de cortes histológicos obtenidos a 12 y 24 días después de la inyección, teñidos con hemetoxilina-eosina. Las ampliaciones muestran que los animales control presentan matrices mixoides (flechas), células pleomórficas y multinucleadas (asteriscos) y figuras mitóticas (puntas de flecha). Barra de escala, 300 μm y barra de escala de la ampliación, 25 μm .

Para comprender mejor las características de estos tumores, realizamos estudios de inmunohistoquímica utilizando el marcador de proliferación celular PCNA y el marcador de apoptosis caspasa 3 activa, tanto en los glioblastomas generados en ratones controles sin tratar como en aquellos tratados durante 12 días con TDZD-8 (Figura 31). La cuantificación de la expresión de PCNA (Figura 31A) demostró que, el tratamiento de los ratones con TDZD-8, es capaz de reducir significativamente la expresión de este marcador. Esto sugiere que TDZD-8 tendría una acción anti-proliferativa en los glioblastomas *in vivo*. Por otra parte, la cuantificación de la expresión de caspasa 3-activa (Figura 31B) en los tumores reveló que, el tratamiento con TDZD-8 aumentaba los niveles de caspasa 3-activa en comparación con su control, al igual que ocurría *in Vitro*. Estos datos muestran que TDZD-8 no solo actúa disminuyendo la capacidad proliferativa *in vivo* de las células tumorales, sino también aumentando la apoptosis.

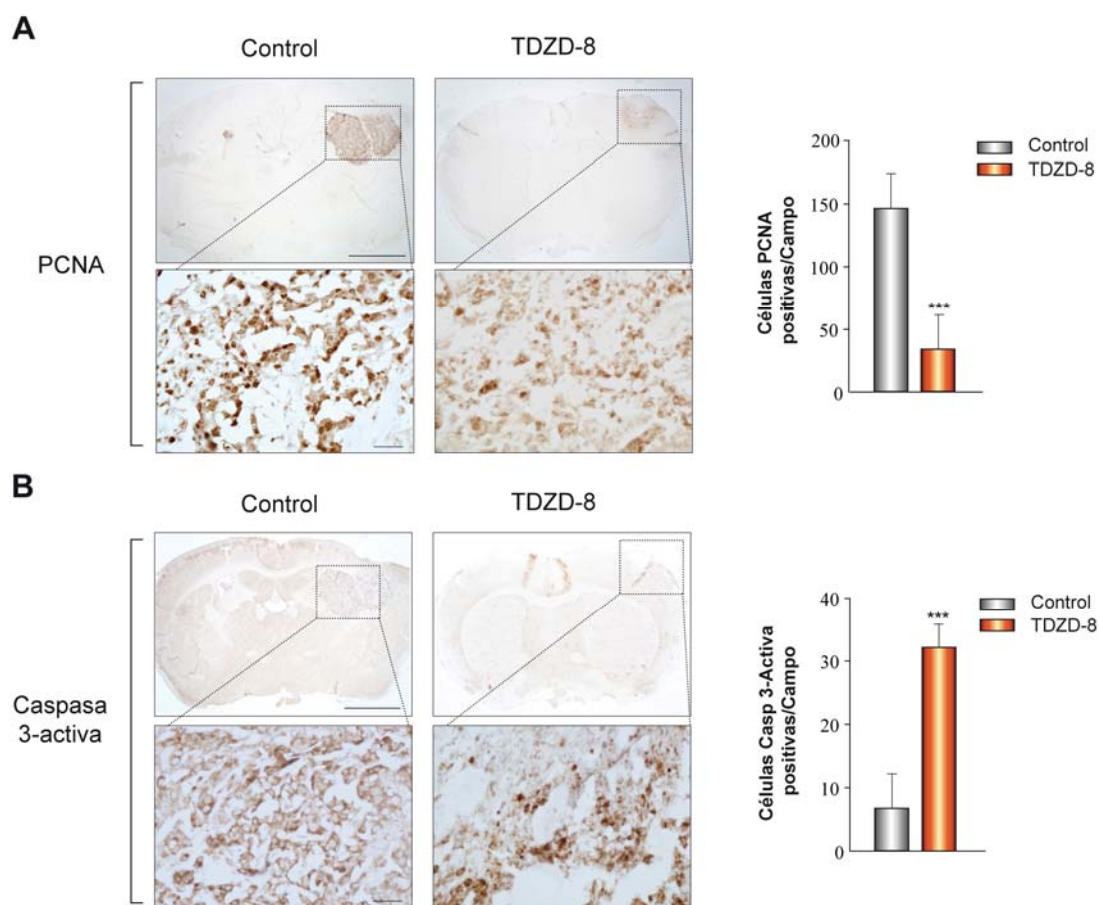


Figura 31. Análisis inmunohistoquímico de los glioblastomas generados por la inyección de las células GL261 después de 12 días. (A) Imágenes representativas de la detección del marcador PCNA en los cortes histológicos con sus respectivas ampliaciones. La gráfica muestra la cuantificación de las células marcadas con el anticuerpo anti-PCNA. Se muestra el valor medio de células marcadas/campo \pm DS. (B) Detección de caspasa 3-activa en el corte histológico y cuantificación de las células positivas para esta proteína. Se muestra el valor medio de células marcadas/campo \pm DS. Barra de escala, 300 μ m y barra de escala de la ampliación, 25 μ m. *** $p \leq 0,001$.

Discusión

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral más común en adultos. En la actualidad esta devastadora enfermedad es prácticamente incurable y los pacientes presentan un tiempo de supervivencia medio de aproximadamente un año después del diagnóstico (Gupta and Sarin, 2002) a pesar del uso de cirugía, radioterapia y quimioterapia (Mitchell et al., 2005). Los glioblastomas representan aproximadamente más de la mitad de los gliomas malignos y muestran una mayor incidencia en la población caucásica que en la africana o asiática (Ohgaki, 2009). La incidencia de estos tumores ha aumentado ligeramente en las últimas dos décadas, especialmente en la población de mayor edad, siendo la edad media de los pacientes diagnosticados de 64 años.

Hasta el momento no se ha identificado claramente una causa para la aparición de este tipo de tumores, sin embargo según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) si se ha demostrado que la tasa de incidencia de tumores cerebrales tiende a ser más alta en países industrializados. Estudios epidemiológicos han revelado que existe un incremento del riesgo de padecer tumores cerebrales asociados con ciertos trabajos en los que existe una exposición a determinados compuestos químicos como el mercurio, arsénico y derivados del petróleo (Navas-Acien et al., 2002) en el caso de gliomas y al plomo en el caso de los meningiomas (Rajaraman et al., 2006). Algunos estudios también sugieren, pero no demuestran de forma concluyente, que existe una relación entre la ocupación laboral de los padres y la incidencia de tumores cerebrales en su descendencia (Cordier et al., 2001). Por otra parte, existen trabajos contradictorios que relacionan un aumento en el riesgo de aparición de gliomas con el tabaquismo (Silvera et al., 2006; Zheng et al., 2001) y con la utilización de teléfonos móviles (Lahkola et al., 2007; Yakymenko and Sidorik, 2010)

El único factor demostrado de riesgo es la exposición a la radiación ionizante (Ohgaki, 2009). Varios estudios demostraron un claro aumento en el riesgo de padecer un tumor cerebral en aquellos niños que recibieron irradiación profiláctica para la leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Pui et al., 2005; Relling et al., 1999). Existen también varios informes sobre la aparición de gliomas después de haber sufrido un traumatismo craneoencefálico, sin embargo estudios epidemiológicos han encontrado únicamente una asociación débil o no significativa entre ambos sucesos (Hochberg et al., 1984; Zhou and Liu, 2010). Polimorfismos en genes que codifican para enzimas implicadas en reparación del DNA se han sugerido también como factores implicados en el desarrollo de glioblastomas (Ohgaki, 2009).

Estudios de expresión génica a gran escala en glioblastomas han permitido analizar la actividad transcripcional presente en estos tumores, permitiendo así su clasificación y predicción de la respuesta a un tratamiento determinado (Brennan et al., 2009; Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010). Un total de 4 subgrupos diferentes de glioblastomas han sido caracterizados hasta el momento: clásico, mesenquimal, proneural y neural, atendiendo a las rutas de transducción de señales y alteraciones génicas descritas en cada uno de ellos (Verhaak et al., 2010). Los perfiles de expresión de cada subgrupo muestran una fuerte correlación con los perfiles de expresión de los distintos linajes neurales. La principal ventaja de definir subgrupos dentro de los glioblastomas, es la de poder aplicar una terapia personalizada, esperando tener una respuesta más homogénea dentro de un mismo subgrupo que entre distintos subgrupos. El glioblastoma clásico, por ejemplo, se caracteriza, por presentar una elevada amplificación del receptor tirosina quinasa EGFR, siendo esta modificación infrecuente en otros subgrupos, pero a su vez no presenta alteraciones en el gen p53, que es el gen más frecuentemente mutado en glioblastomas. Este subgrupo es capaz de responder a la radiación y quimioterapia clásica, probablemente debido a que la respuesta a daño en el DNA mediada por p53 se encuentra intacta en este grupo de pacientes (Van Meir et al., 2010).

Actualmente se están utilizando terapias personalizadas utilizando una primera generación de fármacos específicos dirigidos contra dianas moleculares de las principales rutas de señalización celular alteradas en los glioblastomas. Cuando se utilizan fármacos hacia una única diana se obtiene un porcentaje de respuesta de aproximadamente un 10% o 15%. Este fracaso podría deberse a la existencia de rutas paralelas o compensatorias de función (Wen and Kesari, 2008). Por lo tanto, las estrategias actuales se están centrando en la utilización de fármacos que interfieran con la señalización de varias rutas o distintas dianas dentro de una misma ruta mediante terapias combinadas (Furnari et al., 2007; Sathornsumetee et al., 2007). Ensayos recientes en fase II, han combinado inhibidores de EGFR y radioterapia con el agente alquilante temozolomida (TMZ), para pacientes con glioblastoma de nuevo diagnóstico, pero los resultados observados han sido contradictorios (Van Meir et al., 2010). En el caso de glioblastomas recurrentes, donde la media de supervivencia es de 3 a 6 meses, ensayos en fase II han demostrado un efecto beneficioso utilizando el anticuerpo monoclonal humanizado bevacicumab dirigido contra VEGF (*vascular endothelial growth factor*) en combinación con el fármaco irinotecan, el cual es un inhibidor de la topoisomerasa I. Este protocolo de quimioterapia es esperanzador y

presenta una toxicidad aceptable por el organismo (Vredenburg et al., 2007; Xu et al., 2010). En la actualidad, se encuentra en curso ensayos en fase III evaluando la combinación entre bevacicumab con TMZ y radioterapia.

Al hecho de que las terapias actuales son ineficaces para el tratamiento del glioblastoma hay que sumarle que la resección completa del tumor es casi imposible debido a su naturaleza infiltrante. Debido a esta característica, la recurrencia del glioblastoma tiene lugar en el tejido adyacente a la zona de la extracción (Holland, 2000). Es evidente que los avances realizados en el tratamiento de los glioblastomas siguen siendo insuficientes debido a la alta tasa de mortalidad. En la actualidad no existen estrategias eficaces contra este tipo de tumores y es posible que la resistencia que presentan los glioblastomas a la quimioterapia convencional venga dada por distintos mecanismos. En primer lugar, existen enzimas reparadoras del DNA dentro de las células tumorales como la MGMT (metilguanina-metiltransferasa) que elimina el grupo alquilo introducido por la TMZ u otros agentes alquilantes evitando así la muerte celular. En segundo lugar, dentro del tumor se encuentra una subpoblación de células madre caracterizadas por una baja capacidad de división y proliferación, por lo que los quimioterapéuticos dirigidos contra los mecanismos de división celular no serían eficaces. Y en tercer lugar, muchos fármacos no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, incluso en los tumores de alto grado donde se ha observado un aumento en la permeabilidad de la misma (Clarke et al., 2010).

Debido a que los tratamientos actuales dirigidos hacia determinadas dianas moleculares son esperanzadores, pero ineficaces, nuestro objetivo en este trabajo ha sido la identificación de nuevas dianas terapéuticas contra el glioblastoma multiforme. En conjunto nuestros resultados sugieren que el factor de transcripción C/EBP β y la enzima GSK-3 β , juegan un papel fundamental en el crecimiento del glioblastomas *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo demostramos por primera vez, que la disminución de C/EBP β por RNA de interferencia y la inactivación de GSK-3 β mediante el inhibidor ATP no competitivo TDZD-8, suprimen el crecimiento de las células de glioblastoma. Además, están involucradas en la formación y auto-renovación de las células madre del glioblastoma *in vitro* y en el crecimiento del tumor *in vivo*. Estos resultados indican que C/EBP β y GSK-3 β , juegan un papel importante en el desarrollo del glioblastoma lo que implicaría nuevas funciones de estas proteínas en la patogénesis de los tumores del sistema

nervioso central. En concordancia con nuestros resultados, otros estudios han sugerido que C/EBP β promueve proliferación y supervivencia en glioblastoma. Homma y cols han mostrado que altos niveles de C/EBP β se correlacionan con un mal pronóstico de los pacientes con este tipo de tumores cerebrales (Homma et al., 2006) apoyando la idea de que C/EBP β actúa como un promotor tumoral en glioblastoma.

Con respecto a otros tipos de tumores, Zhu y cols. (Zhu et al., 2002) demostraron que ratones deficientes en C/EBP β son refractarios a la formación de tumores de piel inducidos por el carcinógeno 7,12-dimetil-benz[a]antraceno (DMBA) que produce mutaciones en Ras, sugiriendo un importante papel en la supervivencia de los queratinocitos en respuesta a Ras oncogénico y a la formación de tumores de piel (Sterneck et al., 2006). C/EBP β ha sido implicada también en la supervivencia de los macrófagos transformados *in vitro* con los oncogenes v-Myc/v-Raf (Wessells et al., 2004). Además, la sobreexpresión de C/EBP β es capaz de transformar células epiteliales de mama hacia un fenotipo agresivo (Bundy and Sealy, 2003). Recientemente se ha demostrado que el humo condensado de los cigarrillos es capaz de transformar las células inmortalizadas de cáncer de mama MCF10, esta transformación estaría mediada por la sobreexpresión del gen antiapoptótico bcl-xl que se encuentra regulado por C/EBP β , el cual también se encuentra sobreexpresado en estas células transformadas (Connors et al., 2009). Todos estos estudios, junto con los datos aquí presentados, implican a este factor de transcripción en la progresión tumoral.

En este trabajo demostramos que C/EBP β es un regulador positivo de la proliferación y viabilidad de las células de glioblastoma *in vitro*. La disminución en la expresión de C/EBP β mediante RNA de interferencia conduce a parada del ciclo celular en fase G1, lo que conlleva a una reducción del número de células GL261 que entran en fase S. Este efecto está acompañado de un incremento en la expresión de genes implicados en parada del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA, como son: ATM, Brca1, Brca2, Chk1, Chk2 y p27, dando como resultado un efecto antiproliferativo. Estos resultados apoyan la hipótesis inicial de que la disminución de C/EBP β inhibe la proliferación y la supervivencia de las células de glioblastoma. Además, las regiones reguladoras de estos genes presentan sitios consenso de unión para C/EBP β , sugiriendo que esta proteína podría unirse directamente para regular su expresión. En este trabajo demostramos también que la disminución en la expresión de C/EBP β inhibe la formación de colonias en agar blando, sugiriendo que C/EBP β juega un papel fundamental en el proceso oncogénico de

crecimiento independiente de anclaje y es crítico, por tanto, para el crecimiento del glioblastoma. De acuerdo con estos datos, se ha descrito que la sobreexpresión de C/EBP β en células epiteliales de mama humanas conduce a un crecimiento independiente de anclaje y a un fenotipo invasivo (Bundy and Sealy, 2003).

Nuestro trabajo también muestra que la disminución en los niveles de C/EBP β se relaciona con una disminución en los niveles de mRNA de distintos genes implicados en invasividad y metástasis incluyendo integrina $\alpha 3$ (Itga3), integrina $\beta 3$ (Itgb3), la molécula de adhesión de melanoma 1 (Mcam1), Plaur (*plasminogen activator, urokinase receptor*) y la proteína de unión a calcio S100A4. Además algunos de estos genes como Itgb3, Plaur y Mcam1, junto con Vegfc (factor de crecimiento endotelio vascular C) que también se encontró disminuído en el análisis de expresión génica, han sido implicados en la iniciación de la angiogénesis, lo que podría sugerir un papel de C/EBP β en el desarrollo y mantenimiento del glioblastoma. Estos resultados se encuentran apoyados por una publicación reciente que relaciona la expresión de C/EBP β con un fenotipo mesenquimal en el glioblastoma primario donde las células neurales presentan una capacidad incontrolada para invadir y formar nuevos vasos sanguíneos (Carro et al., 2010).

Además, en este trabajo mostramos que, las líneas celulares interferidas en C/EBP β , poseen una reducción en los niveles de expresión de la proteína S100A4 y presentan una menor capacidad invasiva y de migración que las células controles. Estos datos sugieren, que la disminución de C/EBP β además de estar reduciendo la proliferación, disminuye la capacidad metastática de estas líneas celulares. Este efecto podría estar mediado, al menos en parte, por la regulación de la proteína S100A4, implicada en estos procesos. Nuestros resultados indican que C/EBP β regula la expresión de S100A4 a nivel transcripcional, interaccionando directamente con su promotor. La delección del sitio C/EBP β presente en dicho promotor anula esta regulación. Sin embargo, los ensayos de mutagénesis dirigida contra este sitio no son capaces de inhibir por completo el aumento en la expresión del promotor de S100A4 en respuesta a C/EBP β . Es probable por tanto que esta regulación se lleve a cabo no solo por la unión observada de homodímeros C/EBP β al sitio consenso en el promotor de S100A4, sino también a una interacción de C/EBP β con sitios AP-1 y CREB presentes en la región deleccionada.

En relación con el papel *in vivo* de C/EBP β , la expresión de esta proteína está significativamente aumentada en gliomas de alto grado en comparación con los de bajo grado, y que pacientes cuya expresión de C/EBP β en el tumor es menor tienen una supervivencia mayor que aquellos que presentan una expresión elevada (Homma et al., 2006). Estos resultados están de acuerdo con nuestros datos, que muestran que la disminución de C/EBP β inhibe el crecimiento del tumor *in vivo*. Hemos demostrado que el crecimiento del tumor está significativamente retrasado en ratones inyectados con células interferidas en C/EBP β . Nuestros datos demuestran claramente que aquellos ratones inyectados intracranialmente con las células control, C1, tienen una supervivencia menor que aquellos ratones inyectados con células interferidas en C/EBP β , I4 (Log-Rank $p=0,0012$). Además aquellos glioblastomas deficientes en C/EBP β presentan una menor agresividad que los tumores generados a partir de las células control, incluyendo una menor formación de vasos sanguíneos y un menor número de células gigantes, lo que sugiere que la señalización por C/EBP β además de estar regulando la proliferación, regula la malignidad de las células del glioblastoma *in vivo*. Todos estos datos apoyan la idea de que cambios en la expresión y/o actividad de C/EBP β podrían influir en el desarrollo del glioblastoma.

Como ya se ha comentado en la Introducción, C/EBP β pertenece a una familia de factores de transcripción formada por seis miembros los cuales tienen funciones diferentes en diversos procesos celulares, incluyendo el desarrollo tumoral. Por ejemplo se sabe que C/EBP α , el primer miembro de la familia C/EBP descrito, se comporta como un gen supresor de tumores, cuya disfunción se ha relacionado recientemente con la leucemia mieloide aguda (AML) (Koschmieder et al., 2009). También C/EBP δ parece inhibir la proliferación e células tumorales (Zhang et al., 2008).

Dado que se ha descrito que estos genes se autoregulan entre sí en diversas situaciones como diferenciación de adipocitos, regeneración en respuesta al daño hepático y procesos inflamatorios (Johnson, 2005), nos planteamos si la acción de C/EBP β sobre el desarrollo de glioblastomas podría deberse también en parte a su regulación de otros miembros de la familia C/EBP. Nuestros datos, sin embargo, demuestran que los dos genes anteriormente mencionados, C/EBP α y C/EBP δ , no parecen estar implicados en los efectos

descritos de C/EBP β , ya que sus niveles de expresión no se modifican en células interferidas para este factor de transcripción.

En contraste con nuestros resultados, diversos trabajos sugieren que C/EBP β puede actuar como un supresor tumoral. C/EBP β , al igual que C/EBP α , es capaz de suprimir la proliferación en células de hepatocarcinoma (Buck et al., 1994), queratinocitos (Zhu et al., 1999) y es capaz, vía Ras^{V12}, de cooperar con el complejo RB/E2F para silenciar los genes diana de E2F evitando así la entrada en fase S e induciendo senescencia en fibroblastos de ratón (Sebastian et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que el aumento de expresión de la interleuquina IL-6 por C/EBP β , es esencial para la senescencia inducida por BRAF^{E600} en fibroblastos humanos (Kuilman et al., 2008). Por tanto la pérdida de C/EBP β eliminaría la capacidad de los fibroblastos primarios de ratón para entrar en senescencia mediada por RAS o BRAF, siendo este mecanismo independiente de p53 y mediado por los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas p19^{NK4a} y p15^{INK4b} (Kuilman et al., 2008; Sebastian and Johnson, 2009). A estos datos hay que sumar el hecho de que C/EBP β en respuesta a TGF β (*Transforming Growth Factor β*) es también es capaz de mediar una respuesta citostática mediante la represión transcripcional del oncogen c-Myc y la activación de p15^{INK4b} en células de cáncer de mama (Gomis et al., 2006). Estos datos aparentemente contradictorios con los mostrados en este trabajo podrían deberse al contexto celular en el que se exprese esta proteína y a los mecanismos de regulación de su expresión.

En paralelo al estudio de C/EBP β como nueva diana terapéutica, hemos trabajado también en la caracterización de otras dianas y la identificación de nuevas drogas para el tratamiento de los glioblastomas. Concretamente, nos hemos centrado en inhibidores de la enzima GSK-3 β y sus efectos en el desarrollo de estos tumores. GSK-3 β , al igual que C/EBP β , puede actuar como “supresor” o “promotor tumoral” dependiendo del contexto celular. Sin embargo, la mayoría de los resultados recientes indican que GSK-3 β se comportaría como un regulador positivo del crecimiento de glioblastomas (Kotliarova et al., 2008) y por tanto los inhibidores de GSK-3 β se postulan como buenos candidatos para mejorar la quimioterapia convencional. En este trabajo hemos utilizado la tiadiazolidinona TDZD-8 como inhibidor específico de GSK-3 β y mostramos por primera vez que este compuesto es capaz de suprimir el crecimiento del glioblastoma *in vivo* y mostrar efectos

anti-proliferativos y pro-apoptóticos *in vitro*. Hemos demostrado que TDZD-8 no solo ejerce sus efectos por la vía clásica de inhibir GSK-3 β directamente ocupando el sitio de unión del sustrato prefosforilado, sino que existen distintos mecanismos por los que este compuesto ejercería sus efectos como (1) una activación en la ruta de ERK/p90RSK que conlleva a una fosforilación inhibitoria en Ser9 de GSK-3 β , (2) una inhibición en la actividad de NF- κ B, a través de la inhibición GSK-3 β y (3) un aumento en la actividad de PPAR γ actuando TDZD-8 como agonista de este receptor nuclear.

Estudios recientes revelan que una activación de GSK-3 β esta asociada al desarrollo de cáncer colorrectal y que TDZD-8 tiene un efecto inhibitorio en dicho tumor (Zhu et al., 2010). Además, se ha descrito que la inactivación de GSK-3 β induce apoptosis vía p53 lo que conlleva a su vez a una disminución en el crecimiento de las células del cáncer colorrectal (Ghosh and Altieri, 2005; Tan et al., 2005). Más recientemente, se ha observado que TDZD-8 inhibe la proliferación e induce apoptosis en líneas celulares de mieloma (Zhou et al., 2008) y de progenitores mieloides transformados sin afectar al tejido hematopoyético normal (Guzman et al., 2007). En el caso de tumores en el sistema nervioso central existen resultados contradictorios. Kotliarova y cols. han demostrado, utilizando diferentes líneas de glioblastoma, que la activación de GSK-3 β promueve supervivencia (Kotliarova et al., 2008), mientras que Ma y cols. muestran que la activación de GSK-3 β induce apoptosis en células de neuroblastoma (Ma et al., 2008). Nuestros datos están de acuerdo con los mostrados por Kotliarova y cols., demostrando que la inactivación de GSK-3 β por TDZD-8 inhibe el crecimiento de glioblastomas *in vivo*. Aquellos animales que fueron tratados con este compuesto mostraron un retraso en la aparición y desarrollo del tumor y un mayor tiempo de supervivencia en comparación con los animales no tratados (Log-Rank $p=0,006$). Un hecho importante es que TDZD-8 también es efectiva reduciendo el tamaño del glioblastoma una vez desarrollado. Además, el análisis anatomopatológico de estos tumores reveló una disminución en la malignidad, ya que en los animales tratados se apreció un menor número de focos necróticos y una menor actividad mitótica.

Inicialmente el compuesto TDZD-8 se sintetizó como un inhibidor específico ATP no competitivo de GSK-3 β uniéndose directamente al sitio del sustrato prefosforilado evitando que éste se una (Martinez et al., 2002). Sin embargo, diversas líneas de

investigación indican que TDZD-8 podría ejercer su efecto mediante mecanismos independientes a GSK3- β . En este sentido Guzman y cols. han demostrado que el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de TDZD-8 en progenitores mieloides transformados podría ser independiente a esta inhibición y que estaría mediado por la pérdida de la integridad de la membrana celular, inducción de estrés oxidativo e inhibición de diversas proteínas como la PKC (Proteína Quinasa C) (Guzman et al., 2007).

En relación con las rutas alternativas por las cuales TDZD-8 podría actuar, en este trabajo mostramos que TDZD-8 *in vitro* es capaz de activar a tiempos cortos la ruta de señalización de ERK1/2, promoviendo la expresión del gen temprano EGR-1 y aumentando los niveles de p21. Estos resultados están de acuerdo con estudios en células de glioblastoma humano U87-MG que muestran que una activación en la ruta de señalización de las MAPK da lugar a un aumento en la expresión de EGR-1 la cual está asociada a un aumento en los niveles de p21, lo que resultaría en una disminución en el crecimiento de estas células (Choi et al., 2008).

TDZD-8 es capaz también de inducir una activación de ERK1/2 a tiempos largos, la cual conlleva a la fosforilación y activación de p90RSK, una conocida diana de estas quinasas (Roux et al., 2003; Wang et al., 2003). A su vez, p90RSK activa (pp90RSK) es capaz de fosforilar en Ser 9 a GSK-3 β e inactivarla. En conjunto la activación de estas rutas de señalización darían lugar a los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos observados de este compuesto. Estos resultados están de acuerdo con diversos estudios que muestran que una activación de ERK1/2 esta asociada con una disminución en la supervivencia y parada de ciclo celular en diferentes líneas tumorales, incluyendo células de glioblastoma (Goulet et al., 2005; Tang et al., 2002; Tewari et al., 2008). Por tanto nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción de TDZD-8 en células de glioblastoma se debe no sólo a su inhibición de GSK-3 β mediante una interacción directa con ella, sino también a través de otras vías de señalización que incluyen la fosforilación en Ser 9 de esta enzima vía MAPK.

Datos previos demuestran que la inhibición de GSK-3 β por diferentes compuestos, incluyendo TDZD-8, causan inactivación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B (Collino et al., 2009; Gao et al., 2008) y Kotliarova y cols. muestran también este

efecto en células de glioblastoma (Kotliarova et al., 2008). Además diferentes grupos han relacionado que la supervivencia de diferentes líneas tumorales depende de la actividad de GSK-3 β a través de su regulación de la ruta de NF- κ B y posterior inducción de apoptosis (Deng et al., 2004; Hoeflich et al., 2000; Takada et al., 2004). De acuerdo con estos resultados, en este trabajo mostramos también que el tratamiento de células de glioma GL261 con TDZD-8, da lugar a una disminución en la actividad de NF- κ B en estas células, por tanto los efectos pro-apoptóticos de TDZD-8 presentados en este trabajo podrían deberse, al menos en parte, a su inhibición de la actividad de NF- κ B.

Por otro lado, datos previos de nuestro laboratorio demuestran que otros miembros de la familia de las TDZD, además de ser inhibidores de GSK-3 β pueden activar al receptor nuclear PPAR γ en cerebro (Luna-Medina et al., 2005; Luna-Medina et al., 2007). También datos previos de nuestro grupo han demostrado que ligandos de PPAR γ como la 15-deoxi- Δ^{12-14} -Protaglandina J₂ (15d-PGJ₂) inducen la expresión del gen supresor de tumores BRCA1 en células de cáncer de mama (Pignatelli et al., 2003) y que esta inducción resulta en un aumento de la apoptosis de estas células. De acuerdo con estos datos, en este trabajo mostramos como TDZD-8 es capaz de actuar como un agonista de PPAR γ y posiblemente a través de esta activación se produce un aumento en la expresión de proteínas supresoras de tumores como son BRCA1 y su diana p53. En paralelo a estos resultados, observamos que el tratamiento con TDZD-8 da lugar a una disminución en los niveles de la forma activa de AKT (p-AKT), por lo que pensamos que BRCA1 podría también inducir apoptosis e inhibir proliferación mediante su unión a p-AKT y de esta manera dirigir a esta proteína para su posterior degradación por el proteasoma. Esta hipótesis se basa en el hecho de que se ha descrito que BRCA1 es un regulador negativo de la ruta de AKT ya que mediante su dominio BRCA1-BRCT es capaz de unirse a p-AKT y marcar a esta proteína para su degradación (Xiang et al., 2008). En conclusión, la activación del receptor nuclear PPAR γ por TDZD-8 conduciría a un aumento en los niveles de BRCA1 que activaría por un lado la expresión de p53 y por otro inhibiría parte de la ruta de señalización de PI3K, a través de la degradación de p-AKT. Ambas rutas, además de las comentadas anteriormente, contribuirían a la disminución inducida por TDZD-8 de la viabilidad y proliferación de células de glioblastoma.

Durante los últimos años, cada vez hay mas datos que sugieren que las células madre neurales pueden transformarse dando lugar a las denominadas células madre del cáncer o células iniciadoras del tumor, capaces de escapar a los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación programada (Hambardzumyan et al., 2008; Palm and Schwamborn, 2010; Sanai et al., 2005). Las células madre del glioblastoma se han descrito también como las posibles responsables del mantenimiento y recurrencia del tumor, debido principalmente a la resistencia que presentan hacia las terapias convencionales (Bao et al., 2006a; Kang and Kang, 2007; Lu and Shervington, 2008). La resistencia de estas células madre del glioblastoma hacia la radioterapia, puede ser debida a que presentan una mayor capacidad de respuesta a daño en DNA en comparación con la masa de células tumorales (Bao et al., 2006a), mediante la reducción de los niveles de especies reactivas de oxígeno generados por la radiación y mediante la expresión de transportadores de estos radicales libres hacia el exterior celular como ocurre en las células madre del cáncer de mama tras la radiación (Diehn et al., 2009), por tanto estas células podrían evadir los efectos citotóxicos de la acumulación de las especies reactivas de oxígeno y dar lugar a la recurrencia estos umores. Además, las células madre del glioblastoma presentan resistencia a determinados quimioterapéuticos estándar en el tratamiento de los tumores cerebrales como es la TMZ, debido principalmente a la elevada expresión de la enzima MGMT (Liu et al., 2006). Se ha descrito que una elevada expresión de transportadores que bombean fuera de la célula los agentes quimioterapeuticos podría ser un importante mecanismo de esta quimioresistencia (Donnenberg and Donnenberg, 2005) y diversos estudios indican que las células madre del cáncer sobreexpresan los transportadores de resistencia a drogas ABC (casete de unión ATP) (Dean et al., 2005; Eramo et al., 2006; Li et al., 2008), que producirían bajos niveles del fármaco en el interior de la célula madre. Al igual que las células madre del cáncer de mama las células madre del glioblastoma también presentan una menor actividad del proteosoma 26S, que es esencial para la regulación del ciclo celular, en comparación con la células tumorales normales (Vlashi et al., 2009), lo que sugeriría que los inhibidores proteosómicos utilizados actualmente como antitumorales no serían eficaces.

Por otra parte, las células madre del cáncer presentan un índice bajo de división y proliferación, son células relativamente quiescentes. Este hecho también hace que presenten resistencia a drogas antitumorales convencionales, las cuales van dirigidas contra células que tiene un alto grado de proliferación y que por tanto no serían eficaces en esta

subpoblación celular. A la vista de estos resultados, actualmente se están diseñando diferentes estrategias para promover su diferenciación y así eliminar su resistencia a las terapias convencionales. Dentro de estas estrategias se encuentra el tratamiento con las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), que son capaces de promover diferenciación de las células madre de glioblastoma (Lee et al., 2008; Piccirillo et al., 2006).

En este trabajo hemos abordado también el posible efecto de la expresión de C/EBP β y la inhibición de GSK-3 β sobre la subpoblación de células madres de glioblastoma. Nuestros resultados demuestran que tanto la interferencia de C/EBP β como la inhibición de GSK-3 β por TDZD-8, tienen un efecto inhibitorio no solo sobre la masa tumoral del glioblastoma sino también sobre las células madre, posibles iniciadoras de este tumor. La disminución en la expresión de C/EBP β así como una menor actividad de GSK-3 β inducida por TDZD-8, resultaron en una disminución en la población de células madre en células GL261 así como en su capacidad de auto-renovación. Estos datos sugieren que tanto C/EBP β como GSK-3 β , podrían ser buenas dianas terapéuticas capaces de afectar no solo a la masa tumoral, caracterizada por presentar células con un alto índice de mitosis, sino también a las células madre del glioblastoma que presentan un índice de división mucho menor.

Finalmente, la vasculatura del nicho o “habitat” de las células madre del cáncer también es un objetivo en la terapia contra los GBMs, ya que es el encargado de nutrir y mantener la población de células madre. En este sentido, nuestros resultados derivados del análisis de expresión génica realizado en células de glioblastoma de ratón GL261 controles e interferidas en C/EBP β , muestran que la expresión de genes implicados en formación de nuevos vasos sanguíneos como son *Itgb3*, *Plaur*, *Mcam1* y *Vegfc*, estaba disminuida en aquellas células donde se encontraba disminuida la expresión de C/EBP β , lo que indicaría que C/EBP β podría jugar un importante papel en el mantenimiento de glioblastomas, a través de su regulación de genes implicados en vascularización. Resultados previos en la literatura han demostrado que las células madre tumorales promueven angiogénesis a través de la secreción del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) (Bao et al., 2006b). Estudios en paralelo de diferentes laboratorios han demostrado recientemente que una parte de las células endoteliales que constituyen la

formación de los vasos sanguíneos en el glioblastoma se originan en el propio tumor después haber diferenciado de las células madre tumorales (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). Estos trabajos sugieren que una terapia anti-angiogénica, como el uso del bevacizumab o cediranib (inhibidor del receptor de VEGF), no sólo afectaría a la vasculatura interna del tumor disminuyendo su crecimiento sino que afectaría también al nicho de las células madre del glioblastoma afectando a su proliferación y supervivencia.

En conclusión, nuestros resultados indican que C/EBP β y GSK-3 β , son reguladores cruciales del crecimiento y progresión de glioblastomas, afectando no solo a las células que forman la gran mayoría del tumor sino también a la subpoblación de células madre presentes en estos tumores. Estos datos podrían tener una importante relevancia clínica teniendo en cuenta que estos tumores actualmente no tienen una buena respuesta a las terapias utilizadas, por tanto ambas dianas podrían dar lugar a nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de los glioblastomas.

Conclusiones

1. La disminución del factor de transcripción C/EBP β inhibe la proliferación, supervivencia, invasión y motilidad de células de glioblastoma *in vitro*, e inhibe su crecimiento *in vivo*.
2. C/EBP β regula la expresión de diferentes genes implicados en proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis en células de glioblastoma, los cuales podrían estar mediando su acción en estos tumores.
3. El inhibidor de GSK-3 β TDZD-8, disminuye el crecimiento y aumenta la apoptosis de células de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*.
4. Hemos identificado nuevos mecanismos de acción de TDZD-8 mediante los cuales este compuesto puede retrasar el crecimiento de glioblastomas: 1) TDZD8 activa la ruta de ERK/p90RSK la cual inactiva GSK-3 β por fosforilación en Ser9, 2) inhibe la actividad de NF- κ B a través de la inhibición de GSK-3 β y 3) activa PPAR γ actuando probablemente como un ligando de dicho receptor.
5. La disminución de C/EBP β así como la inhibición de GSK-3 β disminuyen la población de células madre (posibles iniciadoras del tumor) en células murinas GL261 así como su capacidad de auto-renovación.
6. C/EBP β y GSK-3 β podrían representar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de glioblastomas.

Bibliografia

- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J* 9, 1897-1906.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Alberini, C.M., Ghirardi, M., Metz, R., and Kandel, E.R. (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 76, 1099-1114.
- Ambartsumian, N., Klingelhofer, J., Grigorian, M., Christensen, C., Kriaevska, M., Tulchinsky, E., Georgiev, G., Berezin, V., Bock, E., Rygaard, J., *et al.* (2001). The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20, 4685-4695.
- Anastasov, N., Bonzheim, I., Rudelius, M., Klier, M., Dau, T., Angermeier, D., Duyster, J., Pittaluga, S., Fend, F., Raffeld, M., *et al.* (2010). C/EBP β expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica* 95, 760-767.
- Anastasov, N., Klier, M., Koch, I., Angermeier, D., Hofler, H., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2009). Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *J Hematop* 2, 9-19.
- Aragon-Ching, J.B., and Zujewski, J.A. (2007). CNS Metastasis: An Old Problem in a New Guise. *Clin Cancer Res* 13, 1644-1647.
- Axell, M.Z., Zlateva, S., and Curtis, M. (2009). A method for rapid derivation and propagation of neural progenitors from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods* 184, 275-284.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 66, 7843-7848.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67, 4010-4015.
- Bencokova, Z., Pauron, L., Devic, C., Joubert, A., Gastaldo, J., Massart, C., Balosso, J., and Foray, N. (2008). Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. *J Neurooncol* 86, 13-21.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., and Holland, E. (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4, e7752.

- Buck, M., Turler, H., and Chojkier, M. (1994). LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *Embo J* 13, 851-860.
- Bundy, L., Wells, S., and Sealy, L. (2005). C/EBPbeta-2 confers EGF-independent growth and disrupts the normal acinar architecture of human mammary epithelial cells. *Mol Cancer* 4, 43.
- Bundy, L.M., and Sealy, L. (2003). CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 22, 869-883.
- Cao, Q., Lu, X., and Feng, Y.J. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res* 16, 671-677.
- Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-1552.
- Carro, M.S., Lim, W.K., Alvarez, M.J., Bollo, R.J., Zhao, X., Snyder, E.Y., Sulman, E.P., Anne, S.L., Doetsch, F., Colman, H., *et al.* (2010). The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463, 318-325.
- Clarke, P.J., Lawes, M.J., and Midgley, J.J. (2010). Resprouting as a key functional trait in woody plants--challenges to developing new organizing principles. Sprouting behaviour workshops, Working Group 67, ARC-NZ Research Network for Vegetation Function, Armidale, Australia, 2009-2010. *New Phytol* 188, 651-654.
- Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776.
- Collino, M., Aragno, M., Castiglia, S., Tomasinelli, C., Thiemermann, C., Boccuzzi, G., and Fantozzi, R. (2009). Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* 58, 235-242.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.
- Connors, S.K., Balusu, R., Kundu, C.N., Jaiswal, A.S., Gairola, C.G., and Narayan, S. (2009). C/EBPbeta-mediated transcriptional regulation of bcl-xl gene expression in human breast epithelial cells in response to cigarette smoke condensate. *Oncogene* 28, 921-932.
- Cordier, S., Mandereau, L., Preston-Martin, S., Little, J., Lubin, F., Mueller, B., Holly, E., Filippini, G., Peris-Bonet, R., McCredie, M., *et al.* (2001). Parental occupations and childhood brain tumors: results of an international case-control study. *Cancer Causes Control* 12, 865-874.
- Cortes-Canteli, M., Luna-Medina, R., Sanz-Sancristobal, M., Alvarez-Barrientos, A., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2008). CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 121, 1224-1234.
- Cortes-Canteli, M., Pignatelli, M., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2002). CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277, 5460-5467.
- Cortes-Canteli, M., Wagner, M., Ansorge, W., and Perez-Castillo, A. (2004). Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem* 279, 14409-14417.

- Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P., and Rao, V.N. (1999). The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene* 18, 263-268.
- Chan, W.Y., Xia, C.L., Dong, D.C., Heizmann, C.W., and Yew, D.T. (2003). Differential expression of S100 proteins in the developing human hippocampus and temporal cortex. *Microsc Res Tech* 60, 600-613.
- Chang, C.J., Chen, T.T., Lei, H.Y., Chen, D.S., and Lee, S.C. (1990). Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol* 10, 6642-6653.
- Chinery, R., Brockman, J.A., Dransfield, D.T., and Coffey, R.J. (1997). Antioxidant-induced Nuclear Translocation of CCAAT/Enhancer-binding Protein beta . A CRITICAL ROLE FOR PROTEIN KINASE A-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF Ser299. *J Biol Chem* 272, 30356-30361.
- Cho, Y.G., Nam, S.W., Kim, T.Y., Kim, Y.S., Kim, C.J., Park, J.Y., Lee, J.H., Kim, H.S., Lee, J.W., Park, C.H., *et al.* (2003). Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS* 111, 539-545.
- Choi, B.H., Kim, C.G., Bae, Y.S., Lim, Y., Lee, Y.H., and Shin, S.Y. (2008). p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer Res* 68, 1369-1377.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105, 721-732.
- Das, F., Ghosh-Choudhury, N., Kasinath, B.S., and Choudhury, G.G. (2010). TGFbeta enforces activation of eukaryotic elongation factor-2 (eEF2) via inactivation of eEF2 kinase by p90 ribosomal S6 kinase (p90Rsk) to induce mesangial cell hypertrophy. *FEBS Lett* 584, 4268-4272.
- Davies, B.R., O'Donnell, M., Durkan, G.C., Rudland, P.S., Barraclough, R., Neal, D.E., and Mellon, J.K. (2002). Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J Pathol* 196, 292-299.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284.
- Deng, J., Xia, W., Miller, S.A., Wen, Y., Wang, H.Y., and Hung, M.C. (2004). Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Mol Carcinog* 39, 139-146.
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E., and Schibler, U. (1990). LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4, 1541-1551.
- Descombes, P., and Schibler, U. (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67, 569-579.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., *et al.* (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 780-783.

- Dirks, P.B. (2006). Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature* 444, 687-688.
- Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116, 1175-1186.
- Donnenberg, V.S., and Donnenberg, A.D. (2005). Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 45, 872-877.
- Dukhanina, E.A., Dukhanin, A.S., Lomonosov, M.Y., Lukanidin, E.M., and Georgiev, G.P. (1997). Spectral studies on the calcium-binding properties of Mts1 protein and its interaction with target protein. *FEBS Lett* 410, 403-406.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Edwards, E., Geng, L., Tan, J., Onishko, H., Donnelly, E., and Hallahan, D.E. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res* 62, 4671-4677.
- Eichler, A.F., Chung, E., Kodack, D.P., Loeffler, J.S., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). The biology of brain metastases[mdash]translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol advance online publication*.
- Embi, N., Rylatt, D.B., and Cohen, P. (1980). Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry* 107, 519-527.
- Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 13, 1238-1241.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Farago, M., Dominguez, I., Landesman-Bollag, E., Xu, X., Rosner, A., Cardiff, R.D., and Seldin, D.C. (2005). Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 β promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 65, 5792-5801.
- Flammer, J.R., Popova, K.N., and Pflum, M.K. (2006). Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) bind chimeric DNA sites with high affinity. *Biochemistry* 45, 9615-9623.
- Fuentealba, L., Schworer, C., Schroering, A., Rahmatullah, M., and Carey, D.J. (2004). Heregulin and forskolin-induced cyclin D3 expression in Schwann cells: role of a CCAAT promoter element and CCAAT enhancer binding protein. *Glia* 45, 238-248.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.
- Gao, H.K., Yin, Z., Zhou, N., Feng, X.Y., Gao, F., and Wang, H.C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 52, 286-292.

- Ghosh, J.C., and Altieri, D.C. (2005). Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 β in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 11, 4580-4588.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., Nadal, C., Van Poznak, C., and Massague, J. (2006). C/EBP β at the core of the TGF β cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10, 203-214.
- Gongoll, S., Peters, G., Mengel, M., Piso, P., Klemptner, J., Kreipe, H., and von Wasielewski, R. (2002). Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 123, 1478-1484.
- Goulet, A.C., Chigbrow, M., Frisk, P., and Nelson, M.A. (2005). Selenomethionine induces sustained ERK phosphorylation leading to cell-cycle arrest in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 109-117.
- Greenbaum, L.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., and Taub, R. (1998). CCAAT Enhancer-binding Protein β Is Required for Normal Hepatocyte Proliferation in Mice after Partial Hepatectomy. *J Clin Invest* 102, 996-1007.
- Grimes, C.A., and Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.
- Grommes, C., Landreth, G.E., and Heneka, M.T. (2004). Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 5, 419-429.
- Grommes, C., Landreth, G.E., Sastre, M., Beck, M., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Schlegel, U., and Heneka, M.T. (2006). Inhibition of in Vivo Glioma Growth and Invasion by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Treatment. *Molecular Pharmacology* 70, 1524-1533.
- Gupta, T., and Sarin, R. (2002). Poor-prognosis high-grade gliomas: evolving an evidence-based standard of care. *Lancet Oncol* 3, 557-564.
- Guzman, M.L., Li, X., Corbett, C.A., Rossi, R.M., Bushnell, T., Liesveld, J.L., Hebert, J., Young, F., and Jordan, C.T. (2007). Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8). *Blood* 110, 4436-4444.
- Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Carbajal, E., and Holland, E.C. (2008). Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem Cell Rev* 4, 203-210.
- Harris, M.A., Yang, H., Low, B.E., Mukherjee, J., Guha, A., Bronson, R.T., Shultz, L.D., Israel, M.A., and Yun, K. (2008). Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer Res* 68, 10051-10059.
- Hartigan, J.A., and Johnson, G.V. (1999). Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 β -dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 21395-21401.
- Hartigan, J.A., Xiong, W.C., and Johnson, G.V. (2001). Glycogen synthase kinase 3 β is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 485-489.

- Hernan, R., Fasheh, R., Calabrese, C., Frank, A.J., Maclean, K.H., Allard, D., Barraclough, R., and Gilbertson, R.J. (2003). ERBB2 up-regulates S100A4 and several other prometastatic genes in medulloblastoma. *Cancer Res* 63, 140-148.
- Hochberg, F., Toniolo, P., and Cole, P. (1984). Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma. *Neurology* 34, 1511-1514.
- Hoeflich, K.P. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3[beta] in cell survival and NF-[kappa]B activation. *Nature* 406, 86-90.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., and Woodgett, J.R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.
- Holland, E.C. (2000). Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6242-6244.
- Homma, J., Yamanaka, R., Yajima, N., Tsuchiya, N., Genkai, N., Sano, M., and Tanaka, R. (2006). Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* 15, 595-601.
- Hsu, W., Kerppola, T.K., Chen, P.L., Curran, T., and Chen-Kiang, S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol* 14, 268-276.
- Johnson, P.F. (1993). Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol Cell Biol* 13, 6919-6930.
- Johnson, P.F. (2005). Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118, 2545-2555.
- Jope, R.S., and Johnson, G.V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29, 95-102.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., and Beurel, E. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32, 577-595.
- Kang, M.K., and Kang, S.K. (2007). Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev* 16, 837-847.
- Kfoury, N., and Kapatos, G. (2009). Identification of neuronal target genes for CCAAT/enhancer binding proteins. *Mol Cell Neurosci* 40, 313-327.
- Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823-835.
- Kim, M.H., and Fields, J. (2008). Translationally regulated C/EBP beta isoform expression upregulates metastatic genes in hormone-independent prostate cancer cells. *Prostate* 68, 1362-1371.
- Kim, M.H., Minton, A.Z., and Agrawal, V. (2009). C/EBPbeta regulates metastatic gene expression and confers TNF-alpha resistance to prostate cancer cells. *Prostate* 69, 1435-1447.

- Kimura, K., Endo, Y., Yonemura, Y., Heizmann, C.W., Schafer, B.W., Watanabe, Y., and Sasaki, T. (2000). Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 16, 1125-1131.
- Kjaergaard, J., Tanaka, J., Kim, J.A., Rothchild, K., Weinberg, A., and Shu, S. (2000). Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res* 60, 5514-5521.
- Korur, S., Huber, R.M., Sivasankaran, B., Petrich, M., Morin, P., Jr., Hemmings, B.A., Merlo, A., and Lino, M.M. (2009). GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS One* 4, e7443.
- Koschmieder, S., Halmos, B., Levantini, E., and Tenen, D.G. (2009). Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 27, 619-628.
- Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L.C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., Bailey, R., Maric, D., Zenklusen, J.C., Lee, J., *et al.* (2008). Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* 68, 6643-6651.
- Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S., and Leutz, A. (1994). Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev* 8, 2781-2791.
- Kozlova, E.N., and Lukanidin, E. (2002). Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia* 37, 337-348.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133, 1019-1031.
- Lahkola, A., Auvinen, A., Raitanen, J., Schoemaker, M.J., Christensen, H.C., Feychting, M., Johansen, C., Klaeboe, L., Lonn, S., Swerdlow, A.J., *et al.* (2007). Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries. *Int J Cancer* 120, 1769-1775.
- Lamb, J., Ramaswamy, S., Ford, H.L., Contreras, B., Martinez, R.V., Kittrell, F.S., Zahnow, C.A., Patterson, N., Golub, T.R., and Ewen, M.E. (2003). A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell* 114, 323-334.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243, 1681-1688.
- Lee, J., Son, M.J., Woolard, K., Donin, N.M., Li, A., Cheng, C.H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., *et al.* (2008). Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 13, 69-80.
- Lesort, M., Jope, R.S., and Johnson, G.V. (1999). Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72, 576-584.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030-1037.

- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100, 672-679.
- Li, Y., Lu, H.M., Li, G., and Yan, G.M. (2010). Glycogen synthase kinase-3 β regulates astrocytic differentiation of U87-MG human glioblastoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 31, 355-360.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.
- Liu, S., Croniger, C., Arizmendi, C., Harada-Shiba, M., Ren, J., Poli, V., Hanson, R.W., and Friedman, J.E. (1999). Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBP β gene. *J Clin Invest* 103, 207-213.
- Lochhead, P.A., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., and Cleghon, V. (2006). A chaperone-dependent GSK3 β transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* 24, 627-633.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Lu, C., and Shervington, A. (2008). Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 312, 71-80.
- Luna-Medina, R., Cortes-Canteli, M., Alonso, M., Santos, A., Martinez, A., and Perez-Castillo, A. (2005). Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem* 280, 21453-21462.
- Luna-Medina, R., Cortes-Canteli, M., Sanchez-Galiano, S., Morales-Garcia, J.A., Martinez, A., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2007). NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci* 27, 5766-5776.
- Luo, J. (2009). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 273, 194-200.
- Ma, C., Bower, K.A., Chen, G., Shi, X., Ke, Z.J., and Luo, J. (2008). Interaction between ERK and GSK3 β mediates basic fibroblast growth factor-induced apoptosis in SK-N-MC neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283, 9248-9256.
- MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A., and Woodgett, J.R. (2007). Glycogen synthase kinase 3 α -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab* 6, 329-337.
- Malashkevich, V.N., Varney, K.M., Garrett, S.C., Wilder, P.T., Knight, D., Charpentier, T.H., Ramagopal, U.A., Almo, S.C., Weber, D.J., and Bresnick, A.R. (2008). Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* 47, 5111-5126.
- Mantel, N., and Ciminera, J.L. (1979). Use of logrank scores in the analysis of litter-matched data on time to tumor appearance. *Cancer Res* 39, 4308-4315.

- Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Perez, C., and Moreno, F.J. (2002). First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 45, 1292-1299.
- Menard, C., Hein, P., Paquin, A., Savelson, A., Yang, X.M., Lederfein, D., Barnabe-Heider, F., Mir, A.A., Sterneck, E., Peterson, A.C., *et al.* (2002). An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36, 597-610.
- Metz, R., and Ziff, E. (1991). cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev* 5, 1754-1766.
- Mitchell, P., Ellison, D.W., and Mendelow, A.D. (2005). Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet Neurol* 4, 413-422.
- Miyashita, K., Kawakami, K., Nakada, M., Mai, W., Shakoori, A., Fujisawa, H., Hayashi, Y., Hamada, J., and Minamoto, T. (2009). Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3beta inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 15, 887-897.
- Miyatake, S., Martuza, R.L., and Rabkin, S.D. (1997). Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 4, 222-228.
- Moore, B.W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 739-744.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S.C. (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* 81, 1073-1083.
- Nadeau, S., Hein, P., Fernandes, K.J., Peterson, A.C., and Miller, F.D. (2005). A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci* 29, 525-535.
- Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H., and Kishimoto, T. (1992). Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* 79, 460-466.
- Navas-Acien, A., Pollan, M., Gustavsson, P., and Plato, N. (2002). Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in Sweden. *Am J Ind Med* 42, 214-227.
- Ninomiya, I., Ohta, T., Fushida, S., Endo, Y., Hashimoto, T., Yagi, M., Fujimura, T., Nishimura, G., Tani, T., Shimizu, K., *et al.* (2001). Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 18, 715-720.
- Nishio, Y., Isshiki, H., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993). A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13, 1854-1862.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nunes, M.C., Roy, N.S., Keyoung, H.M., Goodman, R.R., McKhann, G., 2nd, Jiang, L., Kang, J., Nedergaard, M., and Goldman, S.A. (2003). Identification and isolation of multipotential

- neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9, 439-447.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.
- O'Brien, W.T., and Klein, P.S. (2009). Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans* 37, 1133-1138.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., and Kim, P.S. (1989). Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243, 538-542.
- Ohgaki, H. (2009). Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 472, 323-342.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 479-489.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., and Imagawa, M. (1996). DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271, 3891-3896.
- Palm, T., and Schwamborn, J.C. (2010). Brain tumor stem cells. *Biological Chemistry* 391, 607-617.
- Park, D.M., and Rich, J.N. (2009). Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells* 28, 7-12.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates (San Diego, Academic Press).
- Phukan, S., Babu, V.S., Kannoji, A., Hariharan, R., and Balaji, V.N. (2010). GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol* 160, 1-19.
- Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., and Vescovi, A.L. (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765.
- Pignatelli, M., Cocca, C., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2003). Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncogene* 22, 5446-5450.
- Pignatelli, M., Cortes-Canteli, M., Lai, C., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J Cell Sci* 114, 4117-4126.
- Pignatelli, M., Sanchez-Rodriguez, J., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2005). 15-Deoxy- Δ^2 -12,14-prostaglandin J2 induces programmed cell death of breast cancer cells by a pleiotropic mechanism. *Carcinogenesis* 26, 81-92.
- Piwien-Pilipuk, G., MacDougald, O., and Schwartz, J. (2002). Dual Regulation of Phosphorylation and Dephosphorylation of C/EBPbeta Modulate Its Transcriptional Activation and DNA Binding in Response to Growth Hormone. *J Biol Chem* 277, 44557-44565.

- Piwien-Pilipuk, G., Van Mater, D., Ross, S.E., MacDougald, O.A., and Schwartz, J. (2001). Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 276, 19664-19671.
- Poli, V. (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273, 29279-29282.
- Poli, V., Mancini, F.P., and Cortese, R. (1990). IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* 63, 643-653.
- Pu, W.T., and Struhl, K. (1991). The leucine zipper symmetrically positions the adjacent basic regions for specific DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6901-6905.
- Pui, C.H., Pei, D., Sandlund, J.T., Campana, D., Ribeiro, R.C., Razzouk, B.I., Rubnitz, J.E., Howard, S.C., Hijiya, N., Jeha, S., *et al.* (2005). Risk of adverse events after completion of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 7936-7941.
- Rajaraman, P., Stewart, P.A., Samet, J.M., Schwartz, B.S., Linet, M.S., Zahm, S.H., Rothman, N., Yeager, M., Fine, H.A., Black, P.M., *et al.* (2006). Lead, genetic susceptibility, and risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2514-2520.
- Ramji, D.P., and Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365, 561-575.
- Rask, K., Thorn, M., Ponten, F., Kraaz, W., Sundfeldt, K., Hedin, L., and Enerback, S. (2000). Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBBeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int J Cancer* 86, 337-343.
- Relling, M.V., Rubnitz, J.E., Rivera, G.K., Boyett, J.M., Hancock, M.L., Felix, C.A., Kun, L.E., Walter, A.W., Evans, W.E., and Pui, C.H. (1999). High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 354, 34-39.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., *et al.* (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824-828.
- Rich, J.N., and Eyler, C.E. (2008). Cancer stem cells in brain tumor biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 411-420.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293-1307.
- Rosty, C., Ueki, T., Argani, P., Jansen, M., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2002). Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* 160, 45-50.
- Roux, P.P., Richards, S.A., and Blenis, J. (2003). Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol* 23, 4796-4804.

- Rudland, P.S., Platt-Higgins, A., Renshaw, C., West, C.R., Winstanley, J.H., Robertson, L., and Barraclough, R. (2000). Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* 60, 1595-1603.
- Saito, Y., Vandenheede, J.R., and Cohen, P. (1994). The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J* 303 (Pt 1), 27-31.
- Saleem, M., Adhami, V.M., Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. (2005). Prognostic significance of metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) in prostate cancer progression and chemoprevention regimens in an autochthonous mouse model. *Clin Cancer Res* 11, 147-153.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., and Berger, M.S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.
- Sathornsumetee, S., Reardon, D.A., Desjardins, A., Quinn, J.A., Vredenburgh, J.J., and Rich, J.N. (2007). Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 110, 13-24.
- Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G., *et al.* (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *Embo J* 14, 1932-1941.
- Schmidt-Hansen, B., Klingelhofer, J., Grum-Schwensen, B., Christensen, A., Andresen, S., Kruse, C., Hansen, T., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2004a). Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 279, 24498-24504.
- Schmidt-Hansen, B., Ornas, D., Grigorian, M., Klingelhofer, J., Tulchinsky, E., Lukanidin, E., and Ambartsumian, N. (2004b). Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 23, 5487-5495.
- Seagroves, T.N., Krnacik, S., Raught, B., Gay, J., Burgess-Beusse, B., Darlington, G.J., and Rosen, J.M. (1998). C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* 12, 1917-1928.
- Sebastian, T., and Johnson, P.F. (2009). RasV12-mediated down-regulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in immortalized fibroblasts requires loss of p19Arf and facilitates bypass of oncogene-induced senescence. *Cancer Res* 69, 2588-2598.
- Sebastian, T., Malik, R., Thomas, S., Sage, J., and Johnson, P.F. (2005). C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *EMBO J* 24, 3301-3312.
- Shakoori, A., Mai, W., Miyashita, K., Yasumoto, K., Takahashi, Y., Ooi, A., Kawakami, K., and Minamoto, T. (2007). Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci* 98, 1388-1393.
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z.W., Zhang, B., Modarressi, M.H., Billadeau, D.D., Mai, M., Takahashi, Y., and Minamoto, T. (2005). Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer:

- its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1365-1373.
- Sherbet, G.V. (2009). Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett* 280, 15-30.
- Silvera, S.A., Miller, A.B., and Rohan, T.E. (2006). Cigarette smoking and risk of glioma: a prospective cohort study. *Int J Cancer* 118, 1848-1851.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267-7273.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Soffietti, R., Ruda, R., and Mutani, R. (2002). Management of brain metastases. *J Neurol* 249, 1357-1369.
- Stein, B., Cogswell, P.C., and Baldwin, A.S., Jr. (1993). Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13, 3964-3974.
- Sterneck, E., Tessarollo, L., and Johnson, P.F. (1997). An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11, 2153-2162.
- Sterneck, E., Zhu, S., Ramirez, A., Jorcano, J.L., and Smart, R.C. (2006). Conditional ablation of C/EBP beta demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 25, 1272-1276.
- Sun, A., Shanmugam, I., Song, J., Terranova, P.F., Thrasher, J.B., and Li, B. (2007). Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate* 67, 976-988.
- Sundfeldt, K., Ivarsson, K., Carlsson, M., Enerback, S., Janson, P.O., Brannstrom, M., and Hedin, L. (1999). The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer* 79, 1240-1248.
- Takada, Y., Fang, X., Jamaluddin, M.S., Boyd, D.D., and Aggarwal, B.B. (2004). Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 279, 39541-39554.
- Takahashi-Yanaga, F., Shiraishi, F., Hirata, M., Miwa, Y., Morimoto, S., and Sasaguri, T. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta is tyrosine-phosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 411-415.
- Takenaga, K., Nygren, J., Zelenina, M., Ohira, M., Iuchi, T., Lukanidin, E., Sjoquist, M., and Kozlova, E.N. (2007). Modified expression of Mts1/S100A4 protein in C6 glioma cells or surrounding astrocytes affects migration of tumor cells in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis* 25, 455-463.

- Tan, J., Zhuang, L., Leong, H.S., Iyer, N.G., Liu, E.T., and Yu, Q. (2005). Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 β promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 65, 9012-9020.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., and Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353-361.
- Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J.M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V.J., Mak, T.W., and Ingram, A.J. (2002). ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277, 12710-12717.
- Tang, Q.Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J.W., Otto, T.C., Pandey, A., and Lane, M.D. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein β by MAPK and glycogen synthase kinase 3 β is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9766-9771.
- Taylor, M.D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., Magdaleno, S., Dalton, J., Calabrese, C., Board, J., *et al.* (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8, 323-335.
- Tewari, R., Sharma, V., Koul, N., and Sen, E. (2008). Involvement of miltefosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J Neurochem* 107, 616-627.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8, 1224-1234.
- Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T., and Chojkier, M. (1994). Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest* 93, 2554-2561.
- Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60, 166-193.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.
- Vlashi, E., Kim, K., Lagadec, C., Donna, L.D., McDonald, J.T., Eghbali, M., Sayre, J.W., Stefani, E., McBride, W., and Pajonk, F. (2009). In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst* 101, 350-359.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., *et al.* (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 25, 4722-4729.
- Wadleigh, D.J., Reddy, S.T., Kopp, E., Ghosh, S., and Herschman, H.R. (2000). Transcriptional Activation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Endotoxin-treated RAW 264.7 Macrophages. *J Biol Chem* 275, 6259-6266.

- Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., *et al.* (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829-833.
- Wang, Z., Zhang, B., Wang, M., and Carr, B.I. (2003). Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J Biol Chem* 278, 11138-11144.
- Weinmann, A.S., and Farnham, P.J. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* 26, 37-47.
- Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507.
- Wessells, J., Yakar, S., and Johnson, P.F. (2004). Critical Prosurvival Roles for C/EBP{beta} and Insulin-Like Growth Factor I in Macrophage Tumor Cells. *Mol Cell Biol* 24, 3238-3250.
- Williams, S.C., Baer, M., Dillner, A.J., and Johnson, P.F. (1995). CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J* 14, 3170-3183.
- Williams, S.C., Cantwell, C.A., and Johnson, P.F. (1991). A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev* 5, 1553-1567.
- Woodgett, J. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9, 2431-2438.
- Xiang, T., Ohashi, A., Huang, Y., Pandita, T.K., Ludwig, T., Powell, S.N., and Yang, Q. (2008). Negative Regulation of AKT Activation by BRCA1. *Cancer Res* 68, 10040-10044.
- Xu, T., Chen, J., Lu, Y., and Wolff, J.E. (2010). Effects of bevacizumab plus irinotecan on response and survival in patients with recurrent malignant glioma: a systematic review and survival-gain analysis. *BMC Cancer* 10, 252.
- Yakymenko, I., and Sidorik, E. (2010). Risks of carcinogenesis from electromagnetic radiation of mobile telephony devices. *Exp Oncol* 32, 54-60.
- Yano, S., Fukunaga, K., Takiguchi, M., Ushio, Y., Mori, M., and Miyamoto, E. (1996). Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 271, 23520-23527.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Tsuji, S., and Akira, S. (1998). Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca²⁺/calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 273, 31345-31351.
- Zagzag, D., Miller, D.C., Chiriboga, L., Yee, H., and Newcomb, E.W. (2003). Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion in vivo. *Brain Pathol* 13, 34-37.
- Zahnow, C.A. (2002). CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res* 4, 113-121.

- Zahnow, C.A. (2009). CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med* 11, e12.
- Zhang, Y., Liu, T., Yan, P., Huang, T., and DeWille, J. (2008). Identification and characterization of CCAAT/Enhancer Binding protein delta (C/EBPdelta) target genes in G0 growth arrested mammary epithelial cells. *BMC Molecular Biology* 9, 83.
- Zheng, T., Cantor, K.P., Zhang, Y., Chiu, B.C., and Lynch, C.F. (2001). Risk of brain glioma not associated with cigarette smoking or use of other tobacco products in Iowa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 413-414.
- Zhou, B., and Liu, W. (2010). Post-traumatic glioma: report of one case and review of the literature. *Int J Med Sci* 7, 248-250.
- Zhou, Y., Uddin, S., Zimmerman, T., Kang, J.A., Ulaszek, J., and Wickrema, A. (2008). Growth control of multiple myeloma cells through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Leuk Lymphoma* 49, 1945-1953.
- Zhu, Q., Yang, J., Han, S., Liu, J., Holzbeierlein, J., Thrasher, J.B., and Li, B. (2010). Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *Prostate*.
- Zhu, S., Oh, H.S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., and Smart, R.C. (1999). C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19, 7181-7190.
- Zhu, S., Yoon, K., Sterneck, E., Johnson, P.F., and Smart, R.C. (2002). CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *PNAS* 99, 207-212.
- Zou, M., Al-Baradie, R.S., Al-Hindi, H., Farid, N.R., and Shi, Y. (2005). S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 93, 1277-1284.

Anexo

Publicaciones que forman parte de la Tesis doctoral:

- **Aguilar-Morante, D.**, Morales-Garcia, J.A., Sanz-SanCristobal, M., Garcia-Cabezas, M.A., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2010). Inhibition of glioblastoma growth by the thiadiazolidinone compound TDZD-8. *PLoS One* 5, e13879.
- **Aguilar-Morante, D.**, Cortes-Canteli, M., Sanz-Sancristobal, M., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2011). Decreased CCAAT/enhancer binding protein beta expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience* 176, 110-119.

Otras publicaciones durante el desarrollo de la Tesis doctoral:

- Perez Castillo, A., **Aguilar-Morante, D.**, Morales-Garcia, J.A., and Dorado, J. (2008). Cancer stem cells and brain tumors. *Clin Transl Oncol* 10, 262-267.
- Cortes-Canteli M, **Aguilar-Morante D.**, Sanz-SanCristobal M, Megias D., Santos A. and Perez-Castillo A. (2011) Role of C/EBP β transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. En revisión.

Inhibition of Glioblastoma Growth by the Thiadiazolidinone Compound TDZD-8

Diana Aguilar-Morante^{1‡}, Jose Angel Morales-Garcia^{1‡}, Marina Sanz-SanCristobal¹, Miguel Angel Garcia-Cabezas³, Angel Santos², Ana Perez-Castillo^{1*}

1 Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, **2** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario “La Paz”, Madrid, Spain

Abstract

Background: Thiadiazolidinones (TDZD) are small heterocyclic compounds first described as non-ATP competitive inhibitors of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). In this study, we analyzed the effects of 4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione (TDZD-8), on murine GL261 cells growth *in vitro* and on the growth of established intracerebral murine gliomas *in vivo*.

Methodology/Principal Findings: Our data show that TDZD-8 decreased proliferation and induced apoptosis of GL261 glioblastoma cells *in vitro*, delayed tumor growth *in vivo*, and augmented animal survival. These effects were associated with an early activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and increased expression of EGR-1 and p21 genes. Also, we observed a sustained activation of the ERK pathway, a concomitant phosphorylation and activation of ribosomal S6 kinase (p90RSK) and an inactivation of GSK-3 β by phosphorylation at Ser 9. Finally, treatment of glioblastoma stem cells with TDZD-8 resulted in an inhibition of proliferation and self-renewal of these cells.

Conclusions/Significance: Our results suggest that TDZD-8 uses a novel mechanism to target glioblastoma cells, and that malignant progenitor population could be a target of this compound.

Citation: Aguilar-Morante D, Morales-Garcia JA, Sanz-SanCristobal M, Garcia-Cabezas MA, Santos A, et al. (2010) Inhibition of Glioblastoma Growth by the Thiadiazolidinone Compound TDZD-8. PLoS ONE 5(11): e13879. doi:10.1371/journal.pone.0013879

Editor: Maciej Lesniak, The University of Chicago, United States of America

Received: July 1, 2010; **Accepted:** October 19, 2010; **Published:** November 8, 2010

Copyright: © 2010 Aguilar-Morante et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Ministerio de Educacion y Ciencia grant SAF2007-62811 (to A.P.-C.). CIBERNED is funded by the Instituto de Salud Carlos III. J.A.M.-G. and M.S.-S. are fellows of CIBERNED. D.A.-M. is a fellow of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: piedras3@med.ucm.es

‡ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Glioblastomas (GBM) are the most frequent and aggressive neoplasm among human primary brain tumors [1]. Despite many efforts to overcome this aggressive disease the median survival of patients with GBM remains less than 12 months from the time of diagnosis [1,2]. Advances in glioma modeling in the mouse have made the disease amenable to *in vivo* functional and molecular studies [3]. Although there have been important advances in our understanding of malignant gliomas and progress in treating them, the mechanisms underlying GBM pathogenesis and poor response to conventional therapy are yet unclear.

GSK-3 β is a serine/threonine kinase which activity is regulated by site-specific phosphorylation. Full activity of this enzyme generally requires phosphorylation at Tyr-216, and conversely, phosphorylation at Ser-9 inhibits GSK-3 β activity. Different studies have shown that GSK-3 β is involved in many biological processes, including cell cycle progression, apoptosis and viability, cytoskeletal organization, cellular metabolism and tumorigenesis [4,5]. Several of these pathways, are implicated in disease pathogenesis, which has prompted efforts to develop GSK-3 β

inhibitors for therapeutic applications. GSK-3 β plays an important role in glucose metabolism and it is thought to facilitate the development of non-insulin-dependent diabetes [6]. Also, GSK-3 β has an important role in promoting inflammatory processes through its activation of the transcription factor NF- κ B [7]. This kinase has also been implicated in the development of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders [8]. Lastly, several studies have identified a specific role for GSK-3 β on proliferation and apoptosis of cancer cells. GSK-3 β activation has been associated with prostate cancer progression [9], and inactivation of this enzyme activates a p53-dependent apoptosis pathway resulting in a diminished colorectal cancer cell growth [10].

The thiadiazolidinone compound TDZD-8 belongs to a family of molecules, which was originally described as non-ATP competitive inhibitors of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) [11,12]. In line with the implication of GSK-3 β -activated pathways in disease pathogenesis, TDZD-8 has been shown to be a protective agent in multiple murine models of disease such as arthritis, spinal cord injury, colitis, and septic shock [13,14,15,16,17]. More recently, TDZD-8 has been shown to selectively induce death of several major forms of leukemia cells,

including malignant myeloid stem and progenitor populations, while sparing normal hematopoietic tissue [18].

In an effort to expand strategies for targeting glioblastoma cells, we have explored the effects of TDZD-8 on glioblastoma development. We demonstrate that TDZD-8 is a potent anti-proliferative and pro-apoptotic agent of glioma cells *in vitro* and *in vivo*. These effects are associated with an early activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), which is followed by an increased expression of the early growth response-1 (EGR-1) and p21. TDZD-8 also elicited a sustained activation of ERK which lead to a phosphorylation of p90RSK and a concomitant inhibition of GSK-3 β through phosphorylation of Ser-9. We also demonstrate that TDZD-8 inhibits the growth and neurosphere formation and self-renewal capacity of GL261 cells. As such, these findings identify TDZD-8 as a potential therapeutic agent for the treatment of high grade gliomas.

Results

TDZD-8 treatment reduces glioblastoma development *in vivo*

To analyze the effects of TDZD-8 on glioblastoma growth *in vivo*, we orthotopically implanted GL261 glioma cells into adult mice brains to generate tumors. The murine glioma GL261 model has been the most common used syngeneic transplant model for both subcutaneous and intracranial experimental glioma tumors [19,20,21]. This particular intracranial animal model recapitulates many of the histopathological and biological features of human glioma including necrosis with pseudopalisading, blood vessels infiltration and presence of giant multinucleated cells [22]. First, we monitored tumor growth *in vivo* by magnetic resonance imaging (MRI) at different times after implantation. Animals treated with TDZD-8 1 day after GL261 cell implantation showed a delayed onset and progression of tumors compared to control animals (Fig. 1A, B). Also, tumor volume, as assessed by T₁-weighed images after gadolinium contrast administration, was significantly reduced in mice treated with TDZD-8 (Fig. 1A). About 84% reduction in tumor volume was observed in tumors derived from TDZD-8-treated animals at 13 days post-injection (Fig. 1C). This strong reduction in the tumor growth potential induced by the compound was also observed 20 days post-injection. Both the log-rank test and Kaplan-Meier analysis of the survival data demonstrated a significant survival advantage for the mice treated with TDZD-8 when compared to their controls (40 *versus* 30 days) (Fig. 1D). Log-rank analysis of the data yielded a *p* value of 0.006. Of note, this delayed tumor growth was also detected when the TDZD-8 treatment was started 6 days after GL261 cell injection (Fig. S1).

We next performed histological examination of tumor tissues 12 and 24 days after treatment (Fig. 2A). Microscopically all the tumors were made of sheets of malignant cells that leaved some microcysts among them. These cells showed highly atypical nuclei with prominent nucleoli and an eosinophilic cytoplasm with filamentous elongations. Many multinucleated malignant cells were also seen (Fig. 2A, asterisks in insets). Altogether these features are characteristic of a typical human high-grade glioma. The grade of pleomorphism and nuclear atypia and the mitotic activity were reminiscent of that found in human glioblastoma multiforme. Tumors from control animals presented more mixoid matrices (Fig. 2A, arrows in insets) and a higher mitotic activity with more than 5 mitotic figures per high power field (Fig. 2A, arrowheads in insets), as compared with TDZD-8-treated animals.

To further understanding on tumors characteristics we performed PCNA and active caspase-3 immunohistochemistry 12 days after implantation to assess the effect of TDZD-8 on proliferation and apoptosis. Quantification of the data revealed that TDZD-8-

treated animals showed a significant reduction of PCNA expression (Fig. 2B), suggesting a growth-suppressing action of this compound *in vivo*. Figure 2B also shows that mice treated during 12 days with TDZD-8 presented tumors with elevated active caspase-3 expression, compared with vehicle-treated animals, indicating that TDZD-8 promoted apoptosis of glioma cells *in vivo*.

TDZD-8 decreases cell proliferation and survival *in vitro*

To understand the mechanism by which TDZD-8 inhibits tumor growth, we initially tested its antiproliferative effect on GL261 glioblastoma cells analyzing BrdU incorporation. Exponentially growing GL261 cells were exposed to 20 μ M TDZD-8 for 24 and 48 h, and their proliferation was monitored. A significant decreased in proliferation was observed in cells treated for both 24 and 48 h with 20 μ M TDZD-8 compared with untreated control cells (Fig. 3A). Additionally, cell viability, measured by the MTT assay, was significantly diminished in TDZD-8-treated cells (Fig. 3B), compared to controls. Thus, TDZD-8 has an antiproliferative effect on GL261 glioblastoma cells. This anti-proliferative effect of TDZD-8 was also observed in other two human glioblastoma cell lines, A172 (Fig. 3C, D) and U373 (Fig. 3E, F).

To further investigate the role of TDZD-8 in cell growth inhibition, cell death was evaluated by active caspase-3 and TUNEL analysis (Fig. 4). Treatment of GL261 cells at different times with TDZD-8 resulted in an increase of apoptosis that was evident by an increase in the abundance of cleaved caspase-3 (Fig. 4A). Yet again, this proapoptotic effect was also observed in the A172 and U373 glioma cell lines. TUNEL analysis of GL261 cells showed a significant increase in the number of apoptotic cells after TDZD8 treatment (Fig. 4C). Addition of the caspase inhibitor N-benzoylcarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro methylketone (zVAD-fmk) inhibited TDZD-8-induced caspase activation and cell death (Fig. 4B, C). Altogether, these results indicate that TDZD-8 treatment led to a growth arrest of glioblastoma cells by a diminution of cell proliferation and an induction of apoptosis.

Effects of TDZD-8 on the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and NF- κ B activation

We next investigated possible signaling pathways involved in the TDZD-8 anti-proliferative effects on glioblastoma cells. Activation of ERK has been associated with a diminution of cell survival in different tumor cell lines, including glioblastoma cell lines [23,24,25]. Therefore, we next investigated the possible involvement of this pathway in the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of TDZD-8 described here. First, we evaluated the phosphorylation status of ERK1/2. As can be seen in Figure 5A, ERK1/2 become rapidly phosphorylated after TDZD-8 treatment. Next, we examined the expression of two genes known to play an important role in cell growth and which are downstream targets of the ERK cascade [26], the early growth response -1 (EGR-1) gene and p21. An increase in the expression of both genes was observed 1 and 2 hours after TDZD-8 addition to GL261 cells (Fig. 5A). In addition to this rapid effect, we also detected a sustained activation of ERK1/2 and a sustained increase of p21 (Fig. 5B, C). Since the ribosomal S6 kinase (p90RSK) is a well-known target of ERK [27,28] and activated p90RSK can inactivate GSK-3 β by phosphorylation at Ser9, we then analyzed the effect of TDZD-8 treatment on the phosphorylation status of these enzymes. As shown in Figure 5B an increase in phosphorylation of p90RSK at Ser380 and GSK-3 β at Ser9 was detected 24 hours after TDZD-8 treatment. Noteworthy, although the increase in phosphorylation of ERK1/2 is not as high as the one observed at shorter time points (Fig. 5A) this enhancement is consistent and sufficient to initiate the signaling cascade leading to activation of their target p90RSK and

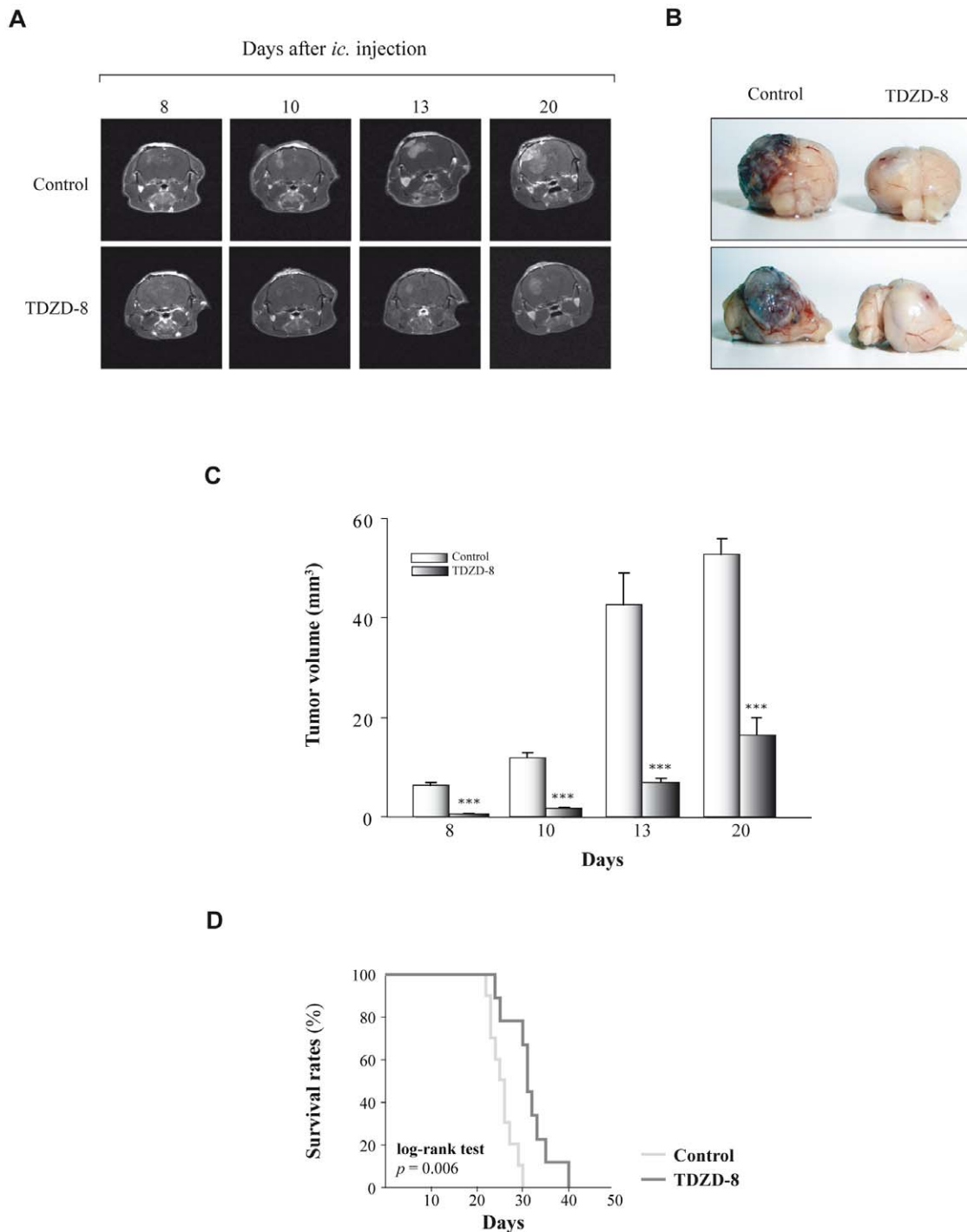


Figure 1. Effects of TDZD-8 treatment on tumor growth *in vivo*. (A) Representative T₁ magnetic resonance imaging (MRI) pictures obtained from mice injected with GL261 and treated with TDZD-8 (5 mg/Kg). T₁-weighted imaging was performed at 7 Tesla as described in Materials and Methods at different times after injection. (B) Representative photographs of GL261 tumors 24 days after implantation are shown. (C) Quantitative analysis of total tumor volumes. Values represent the mean \pm SD from five different animals. (D) Kaplan-Meier plots and log-rank statistics analysis of overall survival reveal that TDZD-8 treatment significantly improves survival of tumor-bearing mice compared with their non-treated controls (log-rank test $p = 0.006$). doi:10.1371/journal.pone.0013879.g001

subsequent inactivation of GSK-3 β . To further substantiate the notion that the ERK/p90RSK pathway is involved in the phosphorylation of GSK-3 β after TDZD-8 treatment, we used the PD98059 inhibitor to block this pathway. Our results show that addition of PD98059 significantly inhibited the phosphorylation of GSK-3 β at Ser9, suggesting that activation of the ERK pathway

plays a major role in the phosphorylation and concomitant inactivation of this enzyme [29].

Since it has been also shown that GSK-3 β regulates tumor cell survival through a NF- κ B-dependent pathway [7,30] we next tested whether GSK-3 β inhibition by TDZD-8 could affect NF- κ B activity in GL261 cells. To this end, we performed transient

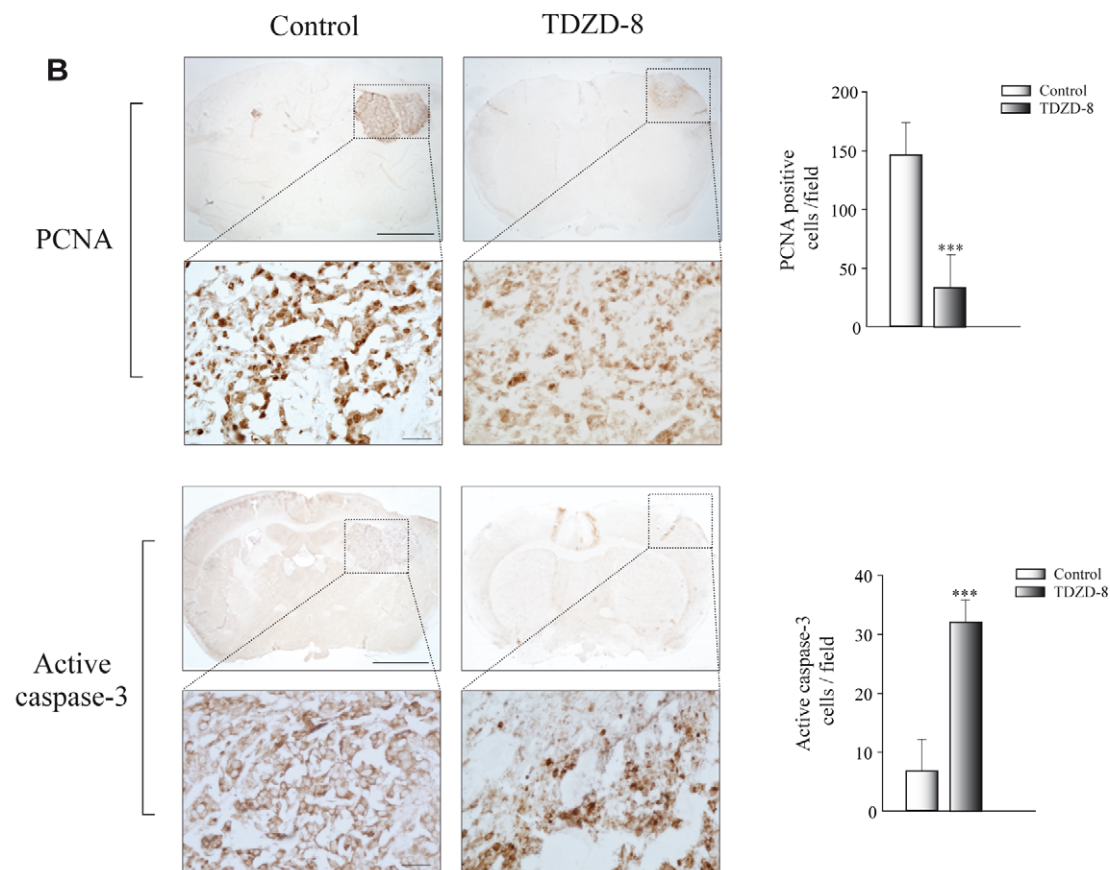
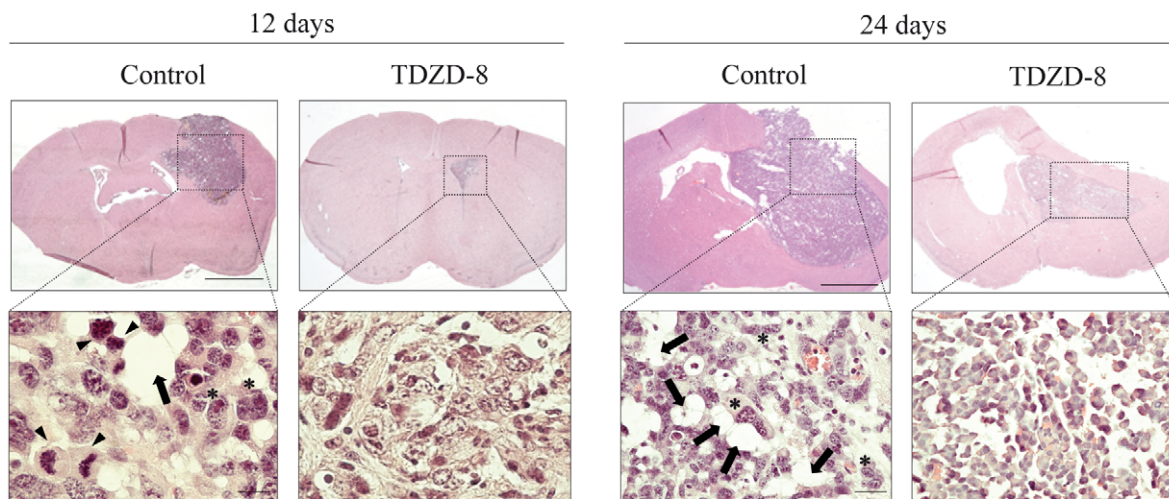
A

Figure 2. Histological and immunohistochemical analysis of tumors induced by GL261 glioblastoma cells. (A) Representative hematoxylin-eosin stained sections of tumors at 12 and 24 days after injection. Insets show higher magnifications of images shown in the upper panels. Tumors derived from control animals showed clear mixoid matrices (arrows), multinucleated malignant and pleomorphic cells (asterisks), and numerous mitotic figures (arrowheads). (B) Immunohistochemical study of tumor sections for PCNA and active caspase-3 detection 12 days after injection of GL261 cells. Insets show a higher magnification of the images shown in the upper panels. Scale bars, 300 μ m. Insets scale bars, 25 μ m. Quantification of the number of active caspase-3 and PCNA positive cells was evaluated in tumor sections and values expressed as mean \pm SD. positive cells/field. *** $p \leq 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0013879.g002

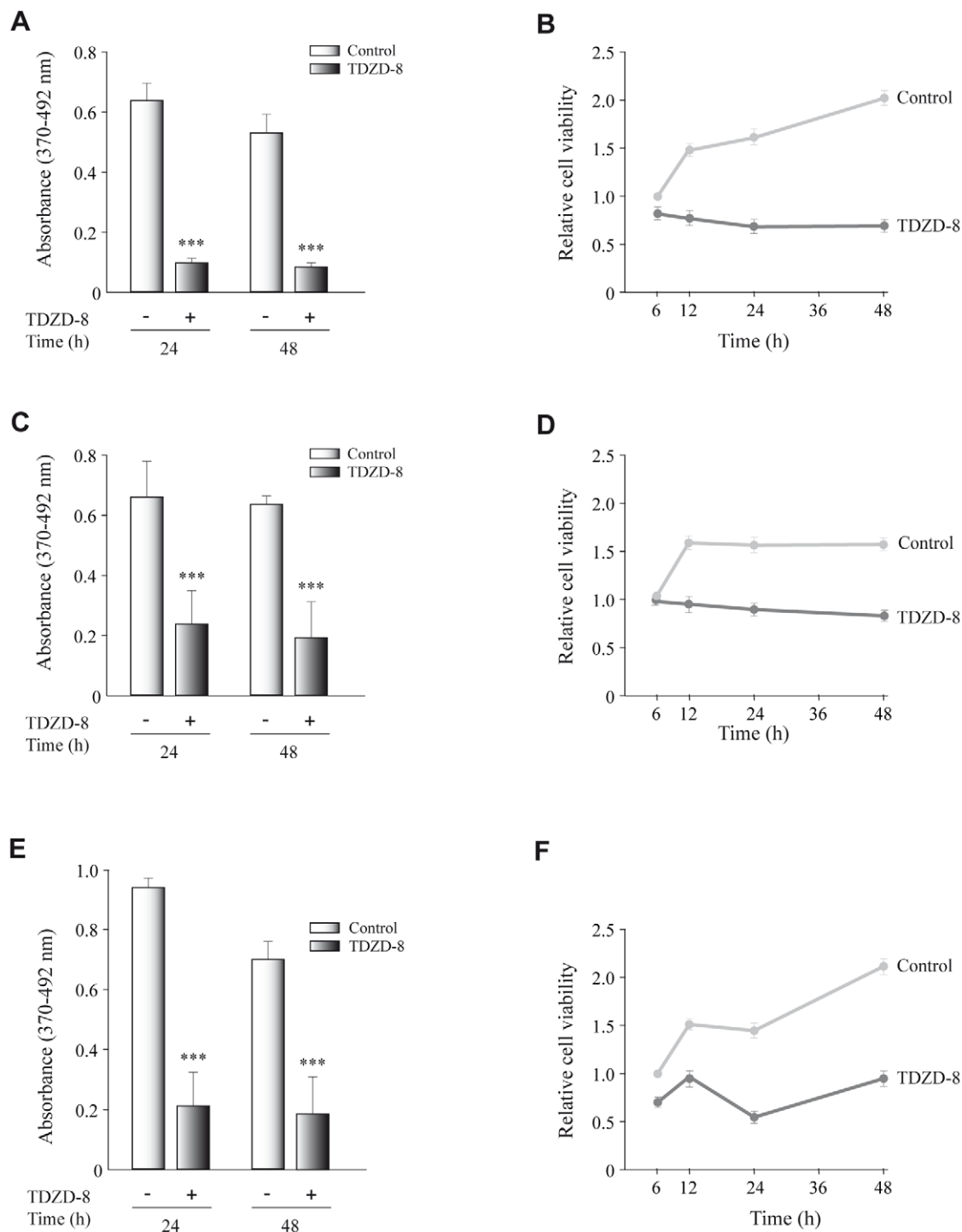


Figure 3. Effect of TDZD-8 treatment on cell proliferation and survival in different glioblastoma cell lines. GL261 (A, B), A172 (C, D) and U373 (E, F). (A, C, E) Proliferation rates determined by a BrdU incorporation assay. Tumoral cells were seeded into individual wells of a 96-well plate and cultivated for 24 and 48 h in the presence or absence of TDZD-8 after which BrdU was added to the culture medium. Cells were harvested 16 h after BrdU addition. Indicated are the means \pm SD measured. (B, D, F) Cells were seeded in a 96-well plate and at different times after plating cell viability was determined by the MTT assay, as indicated in Materials and Methods. Values are the means \pm SD of at least three different experiments. doi:10.1371/journal.pone.0013879.g003

transfection assays using a reporter construct that contains three copies of the consensus NF- κ B response element (3xKBtk-luc) to determine NF- κ B activity in control and TDZD-8-treated cells. As shown in Figure 5D, TDZD-8 inhibited NF- κ B activity, which is in accordance with previously published data [31,32].

Effect of TDZD-8 on glioblastoma stem cells

The emerging cancer stem cell model suggests that tumors are organized in a hierarchy with a subpopulation of cancer stem cells (CSCs) responsible for tumor maintenance and progression. Therefore, we determined whether TDZD-8 could also exert an

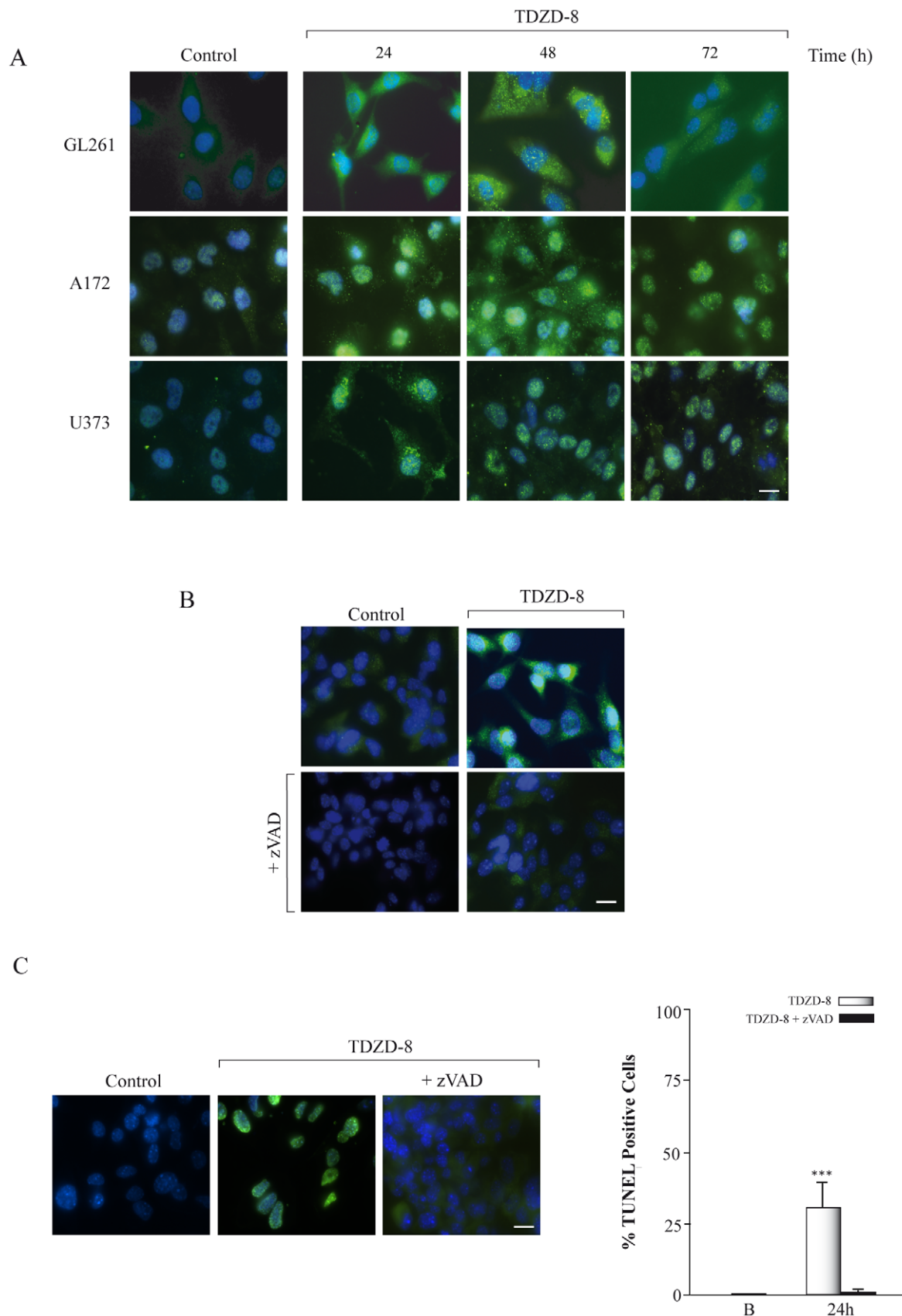


Figure 4. Effect of TDZD-8 treatment on apoptosis. (A) Different glioblastoma cell lines were grown on glass coverslips, treated with TDZD-8 for different times and active caspase-3 was analyzed by immunofluorescence using a specific anti-active caspase-3 antibody. (B) GL261 glioblastoma cells were grown for 24 h on glass coverslips, treated with TDZD-8 or TDZD-8 plus zVAD-fmk and active caspase-3 was analyzed by

immunofluorescence using a specific anti-active caspase-3 antibody. Scale bar, 25 μ m. (C) GL261 glioblastoma cells were grown for 24 h on glass coverslips, treated with TDZD-8 or TDZD-8 plus zVAD-fmk and TUNEL analysis was performed. Representative immunofluorescence images are shown. Scale bar, 25 μ m. Quantification of TUNEL-positive cells 24 h after TDZD-8 treatment is shown in the right panel. B, basal non-treated cells. Values are the means \pm SD of at least three different experiments. doi:10.1371/journal.pone.0013879.g004

antiproliferative effect on progenitor glioblastoma stem cells by analyzing its effect in GBM-derived neurospheres. It has been shown that the major intermediate filament protein Nestin could be used as a marker of brain CSCs as well as normal neural stem and precursor cells [33,34,35,36]. Therefore, as a first step to

establish if TDZD-8 could affect the CSC population in GL261 glioblastoma cells, we examined its effect on the expression of Nestin in adherent cultures of GL261 cells. The results shown in Figure 6A reveal a significant reduction in the protein levels of Nestin in those cultures treated with TDZD-8, which could

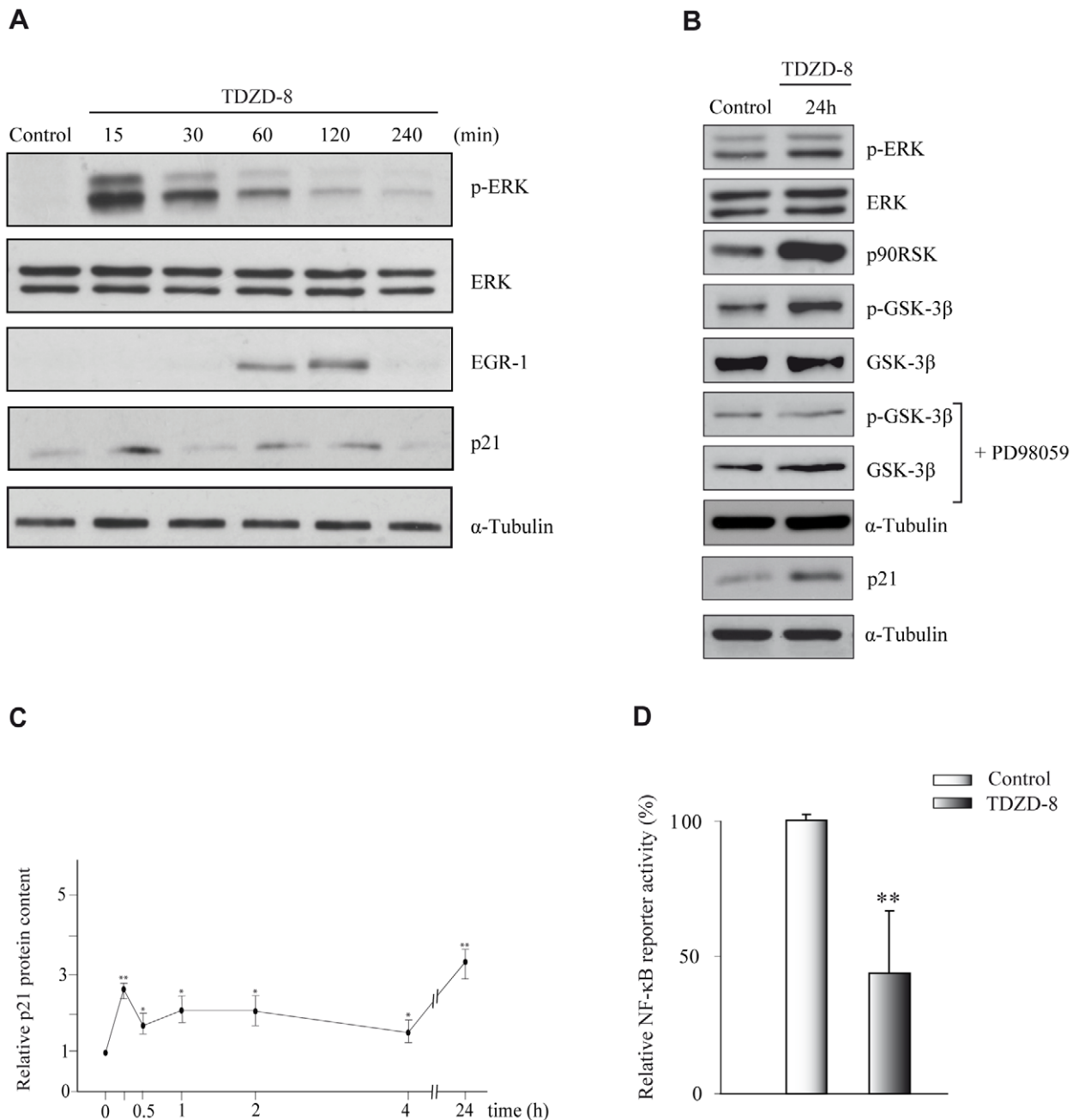


Figure 5. TDZD-8 activates the ERK signaling pathway. (A, B) GL261 cells were treated or not with TDZD-8 for different times and then stained with the corresponding primary antibodies. Some cultures were pretreated for 1 h with the ERK inhibitor PD98059. (C) Quantification of the kinetic induction of p21 by TDZD8. (D) A reporter assay was performed to measure the transcriptional activity of NF-κB. GL261 cells were transfected with 3xNF-tk-luc reporter construct for 48 h in the presence or absence of TDZD-8 and luciferase activity was measured. doi:10.1371/journal.pone.0013879.g005

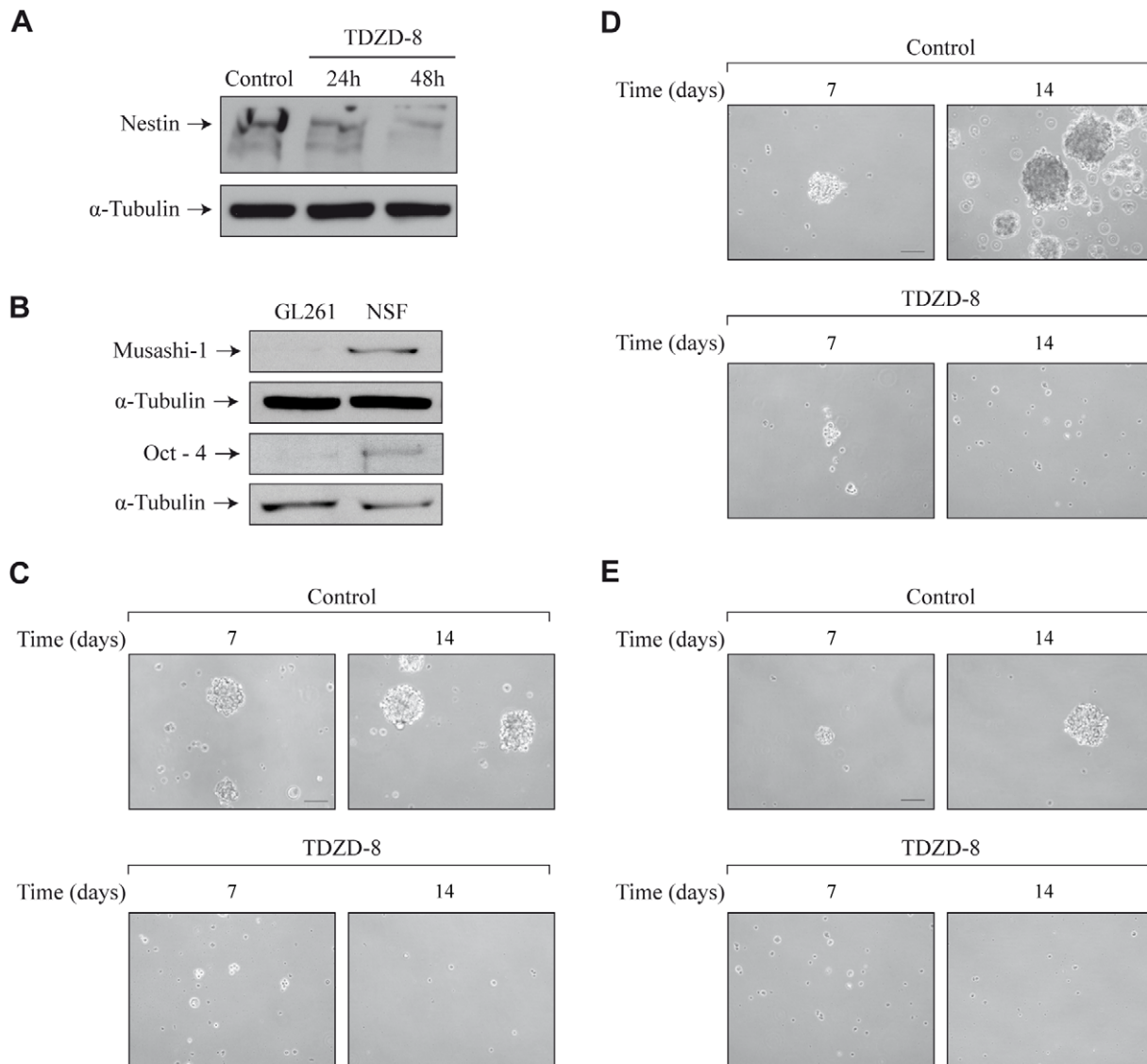


Figure 6. Effect of TDZD-8 on neurosphere formation. (A) Representative Western blot showing Nestin expression in adherent GL261 cells treated with TDZD-8. (B) Representative Western blot of stem cells markers musashi-1 and oct-4 in adherent GL261 and neurosphere cultures 7 days after plating. (C) Representative microphotographs of primary neurosphere cultures 7 and 14 days after plating in neurosphere medium. (D) Primary neurospheres were dissociated and plated to analyze secondary neurosphere formation. Representative microphotographs are shown. (E) Representative microphotographs showing self-renewal capacity of neurosphere cultures growing in the presence or absence of TDZD-8. Scale bar, 100 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0013879.g006

indicate a loss of stem cells induced by this compound. To further elucidate this point, we examined the effects of TDZD-8 on the formation and growth of GL261-derived neurospheres (primary neurospheres). First, we analyzed the levels of two well-known stem cell markers such as musashi-1 and oct-4 in adherent GL261 cells and neurosphere cultures. As shown in Figure 6B an increased amount of these proteins was observed in the neurospheres indicating an increased population of stem cells in these cultures, compared with attached GL261 cells. Next, we studied if TDZD-8 could affect the CSC population in GL261 glioblastoma cells. Figure 6C shows that TDZD-8 inhibited the formation of primary neurospheres. We observed a significant decrease, at both 7 and 14 days of culture, in the number and volume of TDZD-8-treated neurospheres, compared with controls. To more stringently test the effect of TDZD-8 on the ability of GBM cells to generate new spheres, actively growing 7 day-old GL261-derived

primary neurosphere cultures were dissociated, and equal numbers of viable cells were replated in fresh neurosphere medium to generate new neurospheres (secondary neurospheres). Treatment of these cultures with TDZD-8 almost completely blocked the formation of secondary neurospheres (Fig. 6D). Additionally, when primary TDZD-8-treated cultures were dissociated and cultured again for 7 days in the absence of TDZD-8, no formation of secondary neurospheres was observed (data not shown). Finally, to test for the effect of TDZD-8 on the self-renewal of the neurosphere cultures, we dissociated established 7 day-old primary neurosphere cultures, plated them at a very low density [37], and analyzed the capacity to form secondary spheres. As shown in Figure 6E cultures treated with TDZD-8 did not give rise to secondary neurospheres 7 and 14 days after plating, indicating that these cultures did not contain self-renewing stem cells.

Discussion

In this study, we show for the first time that TDZD-8 suppresses the growth of glioma tumors *in vivo* and exerts anti-proliferative and pro-apoptotic activities in glioma cells *in vitro*. These effects were accompanied by an activation of the ERK/p90RSK pathway, a concomitant phosphorylation and inactivation of GSK-3 β , and an inhibition of NF- κ B activity. Finally, our data showing that TDZD-8 decreases the formation of neurospheres, both at low and high cell density, suggest that this drug could have an inhibitory effect on glioblastoma stem cells proliferation and self-renewal. Collectively, our findings suggest that TDZD-8 might be of therapeutic importance for the treatment of high-grade gliomas.

Previous studies have implicated GSK-3 β in tumorigenesis. GSK-3 β activation has been associated with prostate cancer progression and TDZD-8 has an inhibitory effect in these tumor cells [9]. Also, GSK-3 β inactivation induces a p53-dependent apoptotic pathway resulting in a diminished colorectal cancer cell growth [10,38]. More recently, it has been shown that TDZD-8 inhibits proliferation and induces death of myeloma cell lines [39] and of malignant myeloid progenitors, while sparing normal hematopoietic tissue [18]. In the case of tumors from the central nervous system, contradictory results have been reported. Kotliarova et al. using different glioma cell lines have shown that GSK-3 β activation promotes cell survival [30], whereas Ma et al. [40] have shown that GSK-3 β activation is required for the induction of apoptosis in SK-N-MC neuroblastoma cells. Our data are in agreement with the results obtained by Kotliarova et al, here we clearly show that the inactivation of GSK-3 β by TDZD-8 inhibits glioblastoma tumor growth *in vivo*. Thus, tumor development was significantly delayed and animal survival improved ($p = 0.006$) in mice injected with this compound. Moreover, TDZD-8 tumors lacked the aggressiveness of control tumors, including necrotic foci and a higher mitotic activity.

In view of the pleiotropic effects of TDZD-8, it is very likely that different mechanisms can be underlying its action. Initially TDZD-8 was synthesized as a high affinity ATP-non-competitive inhibitor of GSK-3 β [11,12]. However, recently, several lines of evidence indicate that a GSK-3 β -independent mechanism may be involved in TDZD-8 actions. Guzman et al have suggested that the activity of TDZD-8 can be independent of this inhibition since other known GSK-3 β inhibitors fail to induce leukemia-specific cell death [18]. In this regard, we have shown that other TDZD compounds exert anti-inflammatory and neuroprotective effects in the brain through activation of the nuclear receptor PPAR γ [41,42]. Here, we show that TDZD-8 rapidly activates ERK signaling pathway, which promotes EGR1 expression and an increase in p21 levels. Given the fact that this activation is very fast, it is very unlikely that it could be mediated through activation of PPAR γ . Our findings further corroborate other studies showing that an activation of MAPK signaling pathway in U-87MG glioma cells leads to a proliferation arrest mediated by an increase in EGR-1 expression which concomitantly stimulates p21 transcription [26]. In addition, we also show a delayed activation of ERKs in response to TDZD-8, which is followed by a phosphorylation and activation of p90RSK, a well-known target of these kinases [27,28]. This activation results in a phosphorylation and inactivation of GSK-3 β [29]. These results are in agreement with previously published data showing that an activation of ERK is associated with a diminution of cell survival in different tumor cell lines, including glioblastoma cell lines [23,24,25]. Our results therefore suggest that TDZD-8 can inhibit GSK-3 β activity not only by directly interacting with this enzyme but also through its phosphorylation at Ser9 via MAPK pathway activation.

It has been reported that inhibition of GSK-3 β by different compounds, including TDZD-8, causes an inactivation of NF- κ B activity [31,32] and Kotliarova et al have shown that several small molecular inhibitors of GSK-3 β activity inhibit glioma cell survival in part through a decrease in intracellular NF- κ B activity [30]. Consistent with these data we also show here that treatment of GL261 glioma cells with TDZD-8 led to a decrease in NF- κ B activity within these cells. In this regard, other groups have shown that survival of different tumor cells depends on GSK-3 β activity through a NF- κ B-dependent pathway [7,43,44].

There is mounting evidence that neural stem cells can be transformed into cancer stem cells and give rise to malignant gliomas by escaping the mechanisms that control proliferation and programmed differentiation [45,46,47]. Several data implicate glioma stem cells in tumor maintenance and therapeutic resistance [48,49,50], in consequence the discovery of putative brain tumor stem cells identifies a new cellular target that might be susceptible to novel treatments. Our results suggest that, in addition to have an inhibitory effect upon the bulk of glioblastomas, TDZD-8 could also inhibit cancer stem cell growth. Treatment with TDZD-8 resulted in an inhibition of neurosphere formation in culture. TDZD-8 inhibited the proliferation and expansion of these neurospheres and hampered their capacity of self-renewal. One feature that contributes to the ability of a stem cell to survive is its inherent resistance to drugs; in this regard our results are particularly important since they suggest that TDZD-8 could reduce the tumor-initiating cells. Our results provide compelling evidence that TDZD-8 is able to both inhibit the bulk of the tumor, characterized by actively cycling cells, and to hinder the growth of neural stem cells characterized by a low rate of division.

In summary, we have presented here the first evidence that TDZD-8 inhibits gliomagenesis and targets glioma stem-like cells and thus may hold promise for treatment of human gliomas.

Materials and Methods

Animal Experiments

Adult male C57BL/6 mice ($n = 10$ per group) were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/Kg) and medetomidine (0.125 mg/Kg) and positioned in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, CA). To establish intracranial tumors GL261 cells (125,000 cells) were implanted unilaterally into the right hemisphere using the following coordinates from Bregma: posterior -1.06 mm; lateral 3 mm and a depth of 3 mm, according to the atlas of Paxinos and Franklin [51]. The mice were then housed individually to recover. One day after implantation of GL261 cells, two groups of mice were injected daily intraperitoneally with 5 mg/Kg of TDZD-8 (Sigma) or DMSO (control group) during 22 days. In other group of animals, treatment with TDZD-8 was started 6 days after implantation of GL261 cells, during 7 days. All procedures with animals were specifically approved by the 'Ethics Committee for Animal Experimentation' of the Instituto de Investigaciones Biomedicas (CSIC-UAM), permit number PN 2007/108, and carried out in accordance with the protocols issued which followed National (normative 1201/2005) and International recommendations (normative 86/609 from the European Communities Council). Special care was taken to minimize animal suffering.

Magnetic Resonance Imaging

Magnetic Resonance Imaging (MRI) was performed using an MRI scanner (Bruker PharmaScan 7.0T, 16 cm; Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany). Mice brain MRI was performed with a 90 mm gradient insert and a concentric 38 mm birdcage

resonator, using Paravision v4.0 software (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany) as implemented in a Hewlett-Packard console, operating on a Linux platform. MRI examinations used adult male C57BL/6 mice ($n \geq 10$ per group) anaesthetized through a plastic mask with 2% isoflurane in 99.9% O₂. Animals were allowed to breath spontaneously during the experiment and were placed in a heated cradle to maintain the core body temperature at approx. 37°C. The physiological state of the animal was monitored throughout MRI acquisition through the respiratory rate using a Biotrig physiological monitor (Brucker). Gadolinium-DTPA-enhanced T₁-weighted spin-echo images were acquired at 8, 10, 13 and 20 days after injection with a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) [52] sequence in axial orientations (TR: 350 ms, TE: 10.6 ms, averages: 4, FOV: 2.30 cm, acquisition matrix: 256×256, slice thickness: 1.00 mm, number of slices: 16). The *in vivo* spectroscopy protocol acquired two 3×3×3 mm voxels in the striatal area, using a Point-Resolved Spatially Spectroscopy (PRESS) [53] protocol, combined with VAPOR water suppression, [54] (TR: 3000 ms, TE: 35 ms, averages: 128). Tumor area was calculated from T₁-weighted images using Image J Software. Tumor volume was estimated from the summation of tumor areas on each slice, multiplied by slice thickness. Average lesion volume was calculated for each condition.

Histology and Immunohistochemistry

Brains were dissected and embedded in paraffin. Sections of 10 µm thickness were prepared and stained with haematoxylin and eosin. Paraffin embedded sections, were also used for detecting proliferation and apoptosis in tumors. First, sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded concentrations of ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in H₂O₂ and after several rinses in PBS, antigen retrieval was performed by microwaving slides in citrate buffer. Once non-specific binding sites were blocked for 1 hour at room temperature, sections were incubated in humid chamber at 4°C overnight with anti-active caspase-3 (1:200, R&D Systems) and anti-PCNA (1:50, Signet Laboratories). After several rinses, sections were incubated for 1 h with a biotinylated secondary antibody and finally processed following the avidin-biotin protocol (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Tissues were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated, cleared in xylene, and mounted with DePeX (Serva, Heidelberg, Germany). The slides were examined under a Zeiss (Oberkochen, Germany) Axiophot microscope, equipped with an Olympus Optical (Tokyo, Japan) DP-50 digital camera, and a Leica (Nussloch, Germany) MZ6 modular stereomicroscope. For the quantification of active caspase-3 and PCNA expression, the number of positive cells was quantified in 20 random fields at x400 magnification. Data were expressed as mean \pm SD positive cells/field.

Cell culture and treatment

GL261 murine glioblastoma cells were obtained from the NCI-Frederick Cancer Research Tumor Repository (Frederick, MD) and propagated in RPMI medium with 10% fetal bovine serum as described [55]. A172 and U373 human glioblastoma cell lines were obtained from Dr. Manuel Guzman (Complutense University, Madrid, Spain) and propagated in DMEM with 10% FBS. On attaining semiconfluence, and based in dose-response analysis (see Fig. S2), cells were treated with 20 µM TDZD-8, a dose widely used in the literature [18,56], for different time intervals. Following treatment cells were processed for western blot and immunocytochemical analysis.

For neurosphere formation GL261 cells were plated and grown in regular medium (RPMI, 10% FBS, glutamine, gentamicine and fungizone). Two days after plating, supernatant was collected and replated in a defined serum-free tumor sphere medium formed by Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium (1:1) supplemented with B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Peprotech, EC) and 20 ng/ml fibroblast growth factor (FGF, Peprotech, EC). After 1 week in culture some primary neurosphere cultures were treated with TDZD-8 (10 µM) for another 1 week. These primary neurospheres were then dissociated, and 50,000 cells/ml were replated in proliferative conditions, in the absence or presence of TDZD-8, for another 7 or 14 days to score the number of secondary neurospheres generated. For self-renewing experiments, primary neurospheres were dissociated and plated at a density of 2,000 cells/ml for another 7 or 14 days in proliferative medium containing or not TDZD-8. These assays were repeated at least three times in triplicate.

Proliferation assays

The effect of TDZD-8 on cell proliferation was determined using the non-radioactive BrdU-based cell proliferation assay (Roche) according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded in triplicate onto 96-well plates at a density of 2,000 cells/well. After 24 h of growth, cells were treated with 20 µM TDZD-8, 16 h later 10 µM BrdU was added and cells were cultured for another 16 h. BrdU incorporation into the DNA was determined by measuring the absorbance at both 370 and 492 nm on an ELISA plate reader.

Cell viability was measured using the MTT assay (Roche Diagnostic, GmbH), based on the ability of viable cells to reduce yellow MTT to blue formazan. Briefly, cells were cultured in 96-well microlitre plates for various periods of time in the presence or absence of 20 µM TDZD-8, then cells were incubated with MTT (0.5 mg/ml, 4 h) and subsequently solubilized in 10% SDS/0.01 M HCl for 12 h in the dark. The extent of reduction of MTT was quantified by absorbance measurement at 550 nm according to the manufacturer's protocol.

Immunoblot analysis

Cultured cells, both adherent and floating cancer stem cells, were harvested and lysed in ice-cold RIPA buffer and equal quantities of total protein were separated by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman, Dassel, Germany) and blots were probed with the indicated primary antibodies, as previously described [57]. The antibodies used were the following: rabbit polyclonal anti-p-ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-ERK1/2 (Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-p90RSK (1:1000, Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-p-GSK-3β (1:500, Cell Signaling), mouse monoclonal anti-GSK-3β (1:250, BD Transduction), rabbit polyclonal anti-EGR-1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-p21 (1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-Musashi 1 (1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-Oct-4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-Nestin (1:2000; kindly provided by Dr. M. Vallejo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, Spain), and mouse monoclonal anti-α-tubulin (1:5000, Sigma). Secondary peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and rabbit anti-mouse antibodies were from Amersham Biosciences (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) and Jackson ImmunoResearch, respectively.

Immunocytochemical staining

At the end of the treatment period the cultures, grown on glass cover-slips in 24-well cell culture plates, were washed with PBS

and fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde at 25°C and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 30 min at 37°C. After 1 h incubation with the corresponding primary antibody: anti-active caspase-3 (1:500, R&D Systems) cells were washed with PBS and incubated with an Alexa-labeled secondary antibody (Invitrogen, San Diego, CA) for 45 min at 37°C. Images were acquired using a Radiance 2100 confocal microscope (Bio-Rad, Hercules, CA), with a 350 nm diode laser to excite DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and a 488-Argon laser to excite Alexa 488. Confocal microscope settings were adjusted to produce the optimum signal-to-noise ratio. To compare fluorescence signals from different preparations, settings were fixed for all samples within the same analysis.

Determination of apoptotic cells

To calculate the extend of cell death, cells were treated or not with TDZD-8 and TUNEL analysis were performed following the manufacturer's recommendations. Caspase-3 activation was analyzed by immunofluorescence analysis using a specific anti-active caspase-3 antibody. Some cultures were treated with the caspase inhibitor z-VAD-fmk.

Transient transfections

For transient transfection experiments, semi-confluent GL261 cells were transfected with the 3xNF κ B-luc reporter plasmid as previously described [58]. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested for luciferase and β -galactosidase (to determine transfection efficiency) activities by using a reporter assay system (Promega, Madison, WI). Each transient transfection experiment was repeated at least three times in triplicate.

References

- DeAngelis LM (2001) Brain tumors. *N Engl J Med* 344: 114–123.
- Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, et al. (2000) Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* 6: 447–450.
- Fomchenko EI, Holland EC (2006) Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 12: 5288–5297.
- Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29: 95–102.
- Kim L, Kimmel AR (2000) GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 10: 508–514.
- Kaidanovich O, Eldar-Finkelman H (2002) The role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 6: 555–561.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, et al. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406: 86–90.
- De Ferrari GV, Inestrosa NC (2000) Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 1–12.
- Sun A, Shanmugam I, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, et al. (2007) Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate* 67: 976–988.
- Ghosh JC, Altieri DC (2005) Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 β in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 11: 4580–4588.
- Martinez A, Alonso M, Castro A, Perez C, Moreno FJ (2002) First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 45: 1292–1299.
- Martinez A, Castro A, Dorronsoro I, Alonso M (2002) GSK-3 inhibitors as promising drugs for the treatment of Alzheimer disease, cancer, diabetes, and inflammation. *MedResRev* 22: 373–384.
- Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR (2005) Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 193–201.
- Dugo L, Abdelrahman M, Murch O, Mazzon E, Cuzzocrea S, et al. (2006) Glycogen synthase kinase-3 β inhibitors protect against the organ injury and dysfunction caused by hemorrhage and resuscitation. *Shock* 25: 485–491.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Crisafulli C, et al. (2006) Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol* 120: 57–67.
- Cuzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, et al. (2006) Glycogen synthase kinase-3 β inhibition reduces secondary damage in experimental spinal cord trauma. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 79–89.
- Whittle BJ, Varga C, Posa A, Molnar A, Collin M, et al. (2006) Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β . *Br J Pharmacol* 147: 575–582.
- Guzman ML, Li X, Corbett CA, Rossi RM, Bushnell T, et al. (2007) Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8). *Blood* 110: 4436–4444.
- Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, et al. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res* 62: 4671–4677.
- Kjaergaard J, Tanaka J, Kim JA, Rothchild K, Weinberg A, et al. (2000) Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res* 60: 5514–5521.
- Miyatake S, Martuza RL, Rabkin SD (1997) Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 4: 222–228.
- Zagzag D, Miller DC, Chiriboga L, Yee H, Newcomb EW (2003) Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion in vivo. *Brain Pathol* 13: 34–37.
- Goulet AC, Chigbrow M, Frisk P, Nelson MA (2005) Selenomethionine induces sustained ERK phosphorylation leading to cell-cycle arrest in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 26: 109–117.
- Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, et al. (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277: 12710–12717.
- Tewari R, Sharma V, Koul N, Sen E (2008) Involvement of mitofosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J Neurochem* 107: 616–627.
- Choi BH, Kim CG, Bae YS, Lim Y, Lee YH, et al. (2008) p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer Res* 68: 1369–1377.
- Wang Z, Zhang B, Wang M, Carr BI (2003) Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J Biol Chem* 278: 11138–11144.
- Roux PP, Richards SA, Blenis J (2003) Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol* 23: 4796–4804.

Statistics

Other than the survival experiments, Student's test was used to analyze statistical differences between the different groups. Survival curves were plotted with Kaplan-Meier method and survival for the two groups of animals was studied using log-rank test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 Effects of TDZD-8 administered after tumor is established. Representative T₁ magnetic resonance imaging (MRI) pictures obtained from mice treated with TDZD-8 from day 6 after GL261 cells injection. T₁-weighted imaging was performed at 7 Tesla as described in Materials and Methods. The arrow indicates the day the treatment was initiated.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013879.s001 (1.16 MB TIF)

Figure S2 Cell viability in TDZD-8-treated cells. GL261 glioblastoma cells were incubated with various concentrations of TDZD-8 and viability was assessed by the MTT assay, as indicated in Materials and Methods. Values are the means \pm SD of at least three different experiments.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013879.s002 (0.07 MB TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS APC. Performed the experiments: DAM JAMG MSS. Analyzed the data: DAM JAMG MAGC AS APC. Wrote the paper: APC.

29. Eldar-Finkelman H (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8: 126–132.
30. Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, et al. (2008) Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* 68: 6643–6651.
31. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiemermann C, et al. (2009) Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* 58: 235–242.
32. Gao HK, Yin Z, Zhou N, Feng XY, Gao F, et al. (2008) Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 286–292.
33. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64: 7011–7021.
34. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479–494.
35. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267–7273.
36. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, et al. (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8: 323–335.
37. Kong H, Fan Y, Xie J, Ding J, Sha L, et al. (2008) AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells. *J Cell Sci* 121: 4029–4036.
38. Tan J, Zhuang L, Leong HS, Iyer NG, Liu ET, et al. (2005) Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 65: 9012–9020.
39. Zhou Y, Uddin S, Zimmerman T, Kang JA, Ulaszek J, et al. (2008) Growth control of multiple myeloma cells through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Leuk Lymphoma* 49: 1945–1953.
40. Ma C, Bower KA, Chen G, Shi X, Ke ZJ, et al. (2008) Interaction between ERK and GSK3beta mediates basic fibroblast growth factor-induced apoptosis in SK-N-MC neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283: 9248–9256.
41. Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Alonso M, Santos A, Martinez A, et al. (2005) Regulation of Inflammatory Response in Neural Cells in Vitro by Thiadiazolidinones Derivatives through Peroxisome Proliferator-activated Receptor {gamma} Activation. *J Biol Chem* 280: 21453–21462.
42. Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sanchez-Galiano S, Morales-Garcia JA, Martinez A, et al. (2007) NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *The Journal of neuroscience* 27: 5766–5776.
43. Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, Boyd DD, Aggarwal BB (2004) Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of I{kappa}Balpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 279: 39541–39554.
44. Deng J, Xia W, Miller SA, Wen Y, Wang HY, et al. (2004) Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Mol Carcinog* 39: 139–146.
45. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821–5828.
46. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396–401.
47. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353: 811–822.
48. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756–760.
49. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F (2006) The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 98: 1777–1785.
50. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, et al. (2007) WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 618–623.
51. Paxinos G, Franklin K (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
52. Hennig J, Nauerth A, Friedburg H (1986) RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3: 823–833.
53. Bottomley PA (1987) Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 508: 333–348.
54. Tkac I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) In vivo ¹H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41: 649–656.
55. El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS (2006) Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54: 526–535.
56. Kim SD, Yang SI, Kim HC, Shin CY, Ko KH (2007) Inhibition of GSK-3beta mediates expression of MMP-9 through ERK1/2 activation and translocation of NF-kappaB in rat primary astrocyte. *Brain Res* 1186: 12–20.
57. Cortes-Canteli M, Wagner M, Ansorge W, Perez-Castillo A (2004) Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem* 279: 14409–14417.
58. Pignatelli M, Sanchez-Rodriguez J, Santos A, Perez-Castillo A (2005) 15-Deoxy-{Delta}-12,14-prostaglandin J2 induces programmed cell death of breast cancer cells by a pleiotropic mechanism. *Carcinogenesis* 26: 81–92.

DECREASED CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN β EXPRESSION INHIBITS THE GROWTH OF GLIOBLASTOMA CELLS

D. AGUILAR-MORANTE,^a M. CORTES-CANTELI,^{a,1}
M. SANZ-SANCRISTOBAL,^a A. SANTOS^b AND
A. PEREZ-CASTILLO^{a*}

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid. Arturo Duperier, 4 and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED), 28029-Madrid, Spain

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract—C/EBP β is a leucine-zipper transcription factor implicated in the control of metabolism, development, cell differentiation, and proliferation. However, it remains unclear its role in tumor development. Here, we show that down-regulation of C/EBP β by RNA interference inhibits proliferation in the GL261 murine glioblastoma cell line, induces an arrest of the cell cycle at the G0/G1 boundary, and diminishes their transformation capacity and migration. In addition, we show that C/EBP β regulates the expression of several DNA damage response- and invasion-related genes. Lastly, C/EBP β depletion significantly retards tumor onset and prolongs survival in a murine orthotopic brain tumor model. Immunohistochemical analysis revealed a significant diminution of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling in tumors derived from C/EBP β -depleted GL261 cells compared with that in controls. These results show, for the first time, the dependence of glioma cells on C/EBP β and suggest a potential role of this transcription factor in glioma development. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: C/EBP β , glioblastoma, invasion, proliferation, shRNA.

The CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) is a basic leucine zipper transcription factor (Vinson et al., 1989) involved in different cell processes including metabolism, hematopoiesis, adipogenesis, the immune response, and morphogenesis (Poli, 1998; Ramji and Foka, 2002). C/EBP β is also expressed in the central nervous system (Sterneck and Johnson, 1998; Nadeau et al., 2005) where it plays an important role in the consolidation of long-term memory (Alberini et al., 1994; Taubenfeld et al., 2001), and cortical neuronal maturation (Menard et al., 2002). We have demonstrated that C/EBP β is an important factor in neuronal differentiation (Cortes-Canteli et al., 2002) and regulates the expression of several genes involved in inflammatory processes, cancer, and brain injury

(Cortes-Canteli et al., 2004). More importantly, mice lacking C/EBP β show a reduced inflammatory response after an excitotoxic insult and are less susceptible to neuronal cell loss (Cortes-Canteli et al., 2008).

Regarding its implication in proliferation and differentiation processes, different roles have been proposed for C/EBP β . An anti-proliferative function has been suggested in HepG2 hepatocarcinoma cells (Buck et al., 1994), epidermal keratinocytes (Zhu et al., 1999) and primary fibroblasts (Sebastian et al., 2005). Moreover, C/EBP β -knock-out mice display a lymphoproliferative disorder, suggesting that C/EBP β inhibits expansion of the lymphoid cell compartment (Screpanti et al., 1995). However, growth arrest induced by C/EBP β appears to be highly context specific, because in several cases C/EBP β displays potent growth-promoting activity. C/EBP β is highly expressed in colorectal tumors (Rask et al., 2000) and is associated with ovarian tumor progression (Sundfeldt et al., 1999). Ectopic expression of C/EBP β induces proliferation in human mammary epithelial cells (Bundy and Sealy, 2003) and macrophage tumor cells (Wessells et al., 2004). Also, C/EBP β ^{-/-} mice show impaired mammary ductal morphogenesis due to a proliferation defect (Robinson et al., 1998; Seagroves et al., 1998) and are totally resistant to carcinogen-induced skin tumor development (Zhu et al., 2002).

High-grade gliomas, which include glioblastoma (GBM) and anaplastic astrocytoma, are among the most common intrinsic brain tumors in adults and are nearly uniformly fatal (DeAngelis, 2001). Despite significant improvements in the early detection of malignant gliomas, the median survival of patients remains less than 12 months from the time of diagnosis (Benedetti et al., 2000; DeAngelis, 2001). Advances in glioma modeling in the mouse have made the disease amenable to *in vivo* functional and molecular studies (Fomchenko and Holland, 2006). However, the mechanisms underlying GBM pathogenesis and poor response to conventional therapy are yet unclear. Interestingly, it has been recently demonstrated that C/EBP β expression is markedly increased in high-grade glioma compared with low-grade glioma, and low expression in tumor tissue correlates with longer patient survival (Homma et al., 2006).

All these data have prompted us to investigate whether C/EBP β is involved in glioblastoma development. Here, we present evidence that C/EBP β is strongly expressed in glioma cells. Furthermore, reduction of C/EBP β levels inhibits glioblastoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. The demonstration that C/EBP β is a critical positive regulator of glioma growth will provide new targets for the development of future brain tumor treatments.

¹ Present address: Department of Neurobiology and Genetics, The Rockefeller University, New York, NY, USA.

*Corresponding author. Tel: +34-91-585-4436; fax: +34-91-585-4401.

E-mail address: aperez@iib.uam.es (A. Perez-Castillo).

Abbreviations: C/EBP β , CCAAT/enhancer binding protein β ; MRI, magnetic resonance imaging.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of small interfering RNAs and stable transfection

GL261 murine glioblastoma cells were obtained from the NCI-Frederick Cancer Research Tumor Repository (Frederick, MD, USA) and propagated in RPMI medium with 10% fetal bovine serum as described (El Andaloussi et al., 2006). To knockdown C/EBP β expression, siRNA against two different target sites of mouse C/EBP β and a non-targeting siRNA control were obtained from Dharmacon (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The interfering selected sequences were 5'-GAG CGA CGA GTA CAA GAT G-3' (pool I4) and 5'-CCT TTA GAC CCA TGG AAG TTT-3' (pool I5). The oligonucleotides were annealed and the double-stranded oligonucleotides were cloned into pSilencer 4.1 vector (Ambion, Austin, TX, USA), in which shRNAs were expressed under the control of the CMV promoter. The plasmids were transfected into GL261 glioblastoma cells by using Lipofectamin 2000 (Invitrogen, CA, USA) and stable transfectants were selected using 400 μ g/ml of G418 and maintained in this selection medium. Pools C1 (expressing a non-targeting shRNA control) and I4 (expressing a shRNA against C/EBP β) were used throughout the study. LN18 human glioblastoma cells were obtained from Dr. Peinado (Department of Cell and Developmental Biology, Cornell University) and maintained in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 μ g/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Human C/EBP β expression was silenced in LN18 cells using the FUGW lentiviral vector. The interfering selected sequence was: 5'-GAA GAC CGT GGA CAA GCA C-3' (pool FC1). A non-targeting sequence (5'-GCC GCT TTG TAG GAT AGA G-3', pool FS) was also used. These lentiviral vectors were obtained from Dr. Quintanilla-Martinez. For lentiviral infections of LN18 cells, 293T cells were transiently transfected with the appropriate lentiviral expression vector and the vectors pMD2-G, pMDLg/pRRE, and pRSV-Rev, which encode lentiviral proteins. The medium containing lentiviruses was recovered, filtered through a 0.45- μ m filter and added to the recipient cells. The same procedure was repeated 8 h and 24 h later. Pools FS (expressing a non targeting shRNA) and FC1 (expressing a shRNA against C/EBP β) were used in this study.

Immunoblot analysis

Cultured cells were harvested and lysed in ice-cold RIPA buffer and equal quantities of total protein were separated by 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman, Dassel, Germany) and blots were probed with the indicated primary antibodies, as previously described (Cortes-Canteli et al., 2004). The antibodies used were the following: goat polyclonal C/EBP α , rabbit polyclonal anti-C/EBP β , rabbit polyclonal anti-C/EBP δ , rabbit polyclonal anti-Brca1, rabbit polyclonal anti-p27 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), mouse monoclonal anti- α -tubulin (Sigma), mouse monoclonal anti-ATM (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and mouse monoclonal anti-Chk2 (Millipore, Billerica, MA, USA) antibodies. Secondary peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and rabbit anti-mouse antibodies were from Amersham Biosciences (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) and Jackson ImmunoResearch, respectively.

Proliferation assays and cell cycle studies

The effect of C/EBP β expression on cell proliferation was determined using the non-radioactive BrdU-based cell proliferation assay (Roche) according to the manufacturer's protocol. Cells were seeded in triplicate onto 96-well plates at a density of 2000 cells/well. After 24 h of growth, 10 μ M BrdU was added and cells were cultured for another 16 h. BrdU incorporation into the DNA was

determined by measuring the absorbance at both 450 and 690 nm on an ELISA plate reader. BrdU incorporation was also analyzed by immunofluorescence analysis, and the number of stained cells was counted using the Image J program.

Cell viability was measured using the MTT assay (Roche Diagnostic, GmbH, Indianapolis, IN, USA), based on the ability of viable cells to reduce yellow MTT to blue formazan. Briefly, cells were cultured in 96-well microtitre plates for various periods of time, then cells were incubated with MTT (0.5 mg/ml, 4 h) and subsequently solubilized in 10% SDS/0.01 M HCl for 12 h in the dark. The extent of reduction of MTT was quantified by absorbance measurement at 550 nm according to the manufacturer's protocol.

For analysis of progression through the cell cycle cells were fixed in 70% ethanol/PBS, pelleted and resuspended in buffer containing 10 μ g/ml RNase and 0.003% propidium iodide, as previously described (Pignatelli et al., 2001). Cell cycle distribution was determined by flow cytometric analysis utilizing a Cyan MLE-R Cytometer (DAKO-Cytomation, Glostrup, Denmark). Data analysis was performed using the Summit Software (DAKO).

Soft agar colony formation assay

To perform anchorage-independent growth assays, 50,000 cells were resuspended in 1 ml of 0.7% agar in tissue culture medium containing 10% serum in 60 mm plates over a bottom layer of 1% agar in medium. The cells were allowed to grow for 21 days with weekly refeeding. Colonies were stained with p-iodotetrazolium violet and 20 randomly selected fields were photographed under a phase-contrast microscope (10 \times magnification). Colonies were then counted, and the mean number of colonies per plate was calculated. All experiments were done in triplicate.

Cell invasion, migration and wound healing assay

Tumor cell invasion assays were performed using Transwell chambers with 12- μ m pores (Costar) coated with a layer of Matrigel free of growth factors (Collaborative Biomedical). Medium with 20% fetal bovine serum was added to the lower chambers of the Transwells. I4 or C1 cells (50,000) were seeded on top of the Transwell in triplicate in medium without serum and incubated at 37° for 48 h. The bottom filters were fixed and stained with DAPI at the end of the experiments. Cells in the top chambers were removed by wiping with cotton swabs, and the stained cells that had migrated through the Matrigel were counted under a microscope. Ten randomly selected 20 \times microscopic fields were counted. Wound healing assay was used to detect the alteration of cell motility. I4, C1, FS and FC1 cells were seeded onto 60-mm plates and, after overnight incubation, an artificial wound was created using P200 pipette tip to scratch on the confluent cell monolayer. Photomicrograph was taken immediately (time 0 h), so that the migrating cells and closing of scratch wound could be observed. Microphotographs were also taken at 24 and 48 h post wounding. Within each assay the experiments were performed in triplicates.

PCR-array

Total RNA was extracted from C1 and I4 pools by using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA contamination was eliminated by Dnase treatment and C/EBP β expression was tested by PCR before starting PCR-Array procedure. Mouse Cancer and Cell Cycle RT Profiler PCR Arrays were purchased from SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA). PCR was performed on ABI Prism 7700 Sequence detector (Applied Biosystems). Data were analyzed using the DDCT method and the housekeeping genes HPRT1, GAPDH, and β -actin for normalization. For each gene fold-changes were calculated as difference in gene expression between C1 and I4 pools.

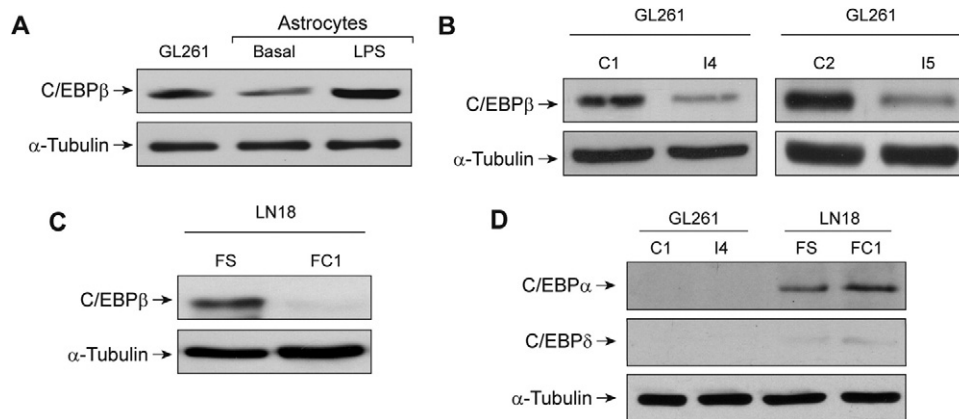


Fig. 1. Expression of C/EBP β . (A) Western blot showing C/EBP β expression in the glioblastoma murine cell line GL261 and in primary cultures of astrocytes in basal conditions and after 24 h of lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Mouse primary astrocytes, were harvested and cultured as previously described (Luna-Medina et al., 2007). Cultures were stimulated with lipopolysaccharide (10 μ g/ml, LPS) and cells were harvested 24 h later. (B) Expression of C/EBP β in control (C1, C2) and C/EBP β -depleted (I4, I5) GL261 pools, as assessed by Western blot analysis. The Westerns shown are representative of three different experiments. (C) Expression of C/EBP β in control (FS) and C/EBP β -depleted (FC1) human LN18 cells. (D) Representative Western blot showing expression of C/EBP α and C/EBP δ in GL261 (C1 and I4) and LN18 (FS and FC1) cells.

Animal experiments

Adult male C57BL/6 mice ($n \geq 7$ per group) were anaesthetized by i.p. injection of ketamine (60 mg/kg) and medetomidine (0.125 mg/kg) and positioned in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, CA, USA). To establish intracranial tumors I4 or C1 cells (100,000 cells) were implanted unilaterally into the left hemisphere using the following coordinates from Bregma: posterior -1.06 mm; lateral -3 mm and a depth of 3 mm, according to the atlas of Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). The mice were then housed individually to recover. All procedures with animals were carried out in accordance with the protocols issued by the 'Ethics Committee for Animal Experimentation' of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM), which followed National (normative 1201/2005) and International recommendations (normative 86/609 from the European Communities Council). Special care was taken to minimize animal suffering.

Magnetic resonance imaging

Magnetic Resonance Imaging (MRI) was performed using an MRI scanner (Bruker PharmaScan 7.0 T, 16 cm; Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany). Mice brain MRI was performed with a 90 mm gradient insert and a concentric 38 mm birdcage resonator, using Paravision v4.0 software (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Germany) as implemented in a Hewlett–Packard console, operating on a Linux platform. MRI examinations used adult male C57BL/6 mice ($n \geq 7$ per group) anaesthetized through a plastic mask with 2% isoflurane in 99.9% O₂. Animals were allowed to breathe spontaneously during the experiment and were placed in a heated cradle to maintain the core body temperature at approx. 37 °C. The physiological state of the animal was monitored throughout MRI acquisition through the respiratory rate using a Biotrig physiological monitor (Brucker). Gadolinium-DTPA-enhanced T₁-weighted spin-echo images were acquired at 11, 15, and 18 days after injection with a Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) (Hennig et al., 1986) sequence in axial orientations (TR: 350 ms, TE: 10.6 ms, averages: 4, FOV: 2.30 cm, acquisition matrix: 256 \times 256, slice thickness: 1.00 mm, number of slices: 16). The *in vivo* spectroscopy protocol acquired two 3 \times 3 \times 3 mm³ voxels in the striatal area, using a Point-Resolved Spatially Spectroscopy (PRESS) (Bottomley, 1987) protocol, combined with VAPOR water suppression, (Tkac et al., 1999) (TR: 3000 ms, TE: 35 ms, averages: 128). The tumor area was

calculated from T₁-weighted images using image J analysis software. Tumor volume was estimated from the summation of tumor areas on each slice, multiplied by slice thickness.

Histology and immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded sections (4 μ m) from tumors were deparaffinized in xylene, rehydrated in a graded series of alcohols, and rinsed in distilled water. All immunohistochemistry analysis were performed as previously described (Luna-Medina et al., 2007). The proliferative activity of the tumor was assessed with anti-PCNA antibody.

Statistics

Other than the survival experiments, Student's test was used to analyze statistical differences between the different groups. Survival curves were plotted with Kaplan–Meier method and survival for the two groups of animals was studied using log-rank test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of C/EBP β depletion on GL261 cell proliferation and viability

We first analyzed the basal level of expression of C/EBP β in murine GL261 glioblastoma cells. Our results showed increased C/EBP β expression in contrast to primary astrocytes, and these levels were very similar to those present in lipopolisaccharide-activated astrocytes (Fig. 1A). To investigate the cellular action of the C/EBP β protein in GL261 cells, we stably introduced a pSilencer vector encoding shRNA for C/EBP β or non-targeting shRNA (see "Experimental procedures"), and different geneticin-resistant pools were tested for C/EBP β expression using an antibody specific for C/EBP β . We evaluated the efficacy of shRNA transfection in the silencing of gene expression of C/EBP β by using Western blot analysis. The immunoblot in Fig. 1B shows that in two of these interfered pools, I4 and I5, the content of C/EBP β protein decreased approximately 75%, as compared to control C1 and C2 pools. For

this reason we selected the I4 and C1 pools for subsequent studies. Fig. 1C shows a dramatic decrease in the protein levels of C/EBP β in the human LN18 cells expressing the shRNA for this mRNA (FC1) compared to control cells expressing a non-target sequence (FS). In order to confirm the specificity of the shRNA used and to demonstrate that it does not interfere or modulate by compensatory effect the expression of other members of the C/EBP family, we performed Western blot analysis to measure the protein levels of C/EBP α and C/EBP δ , the other two members of the family which have been implicated in tumorigenesis. As can be observed in Fig. 1D, neither of them were detected in GL261 cells. LN18 cells presented some expression of C/EBP α and very little of C/EBP δ , though their expression was similar in the control and interfered pools.

We next investigated whether glioma cell proliferation is directly affected by C/EBP β . Although down-regulation of C/EBP β in glioma cells did not alter cell morphology (data not shown), proliferation, as measured by BrdU incorporation and subsequent ELISA analysis (Fig. 2A) was decreased to 50% in the I4 pool compared with control cells. These results were similar to those obtained with the I5 pool. This growth inhibitory effect was further confirmed by BrdU immunocytochemical analysis (Fig. 2B). Additionally, cell viability, measured by the MTT assay, was significantly diminished in the I4 pool, compared to its C1 control pool (Fig. 2C). This decrease in cell viability was also observed in the interfered human FC1 glioblastoma cells, compared to control FS cells. These data show that C/EBP β plays a vital role in maintaining glioblastoma cell proliferation. To better understand the nature of the growth retardation associated with decreased expression of C/EBP β , we next performed cell cycle analysis. The proportion of cells at specific stages of the cell cycle was determined by flow cytometry. It was observed (Fig. 2D) that the cell cycle profiles of I4 cells were significantly altered, with a block at the G0/G1 boundary, less cells progressing through the S-phase than the control C1 cells and a concomitant decline in the number of cells in G2/M phase. We also observed an increase in the sub-G0/G1 subpopulation suggesting an increase in the number of apoptotic cells in the pool I4 with lower expression of C/EBP β . The ability of cancer cells to grow without adhering to extracellular matrix proteins (anchorage-independent growth) correlates closely with their ability to form malignant tumors. Anchorage-independent growth presumably allows the cells to invade and metastasize, characteristics that distinguish malignant from benign tumors. Thus, to assess the effect of C/EBP β expression on anchorage-independent growth of GL261 cells, we seeded C1 and I4 cells in medium containing 0.7% agar, and counted colonies 21 days later. As shown in Fig. 2E, we observed a significant reduction in the number of the colonies of C/EBP β knock down cells compared with control-transfected cells (45 ± 7 and 120 ± 9 colonies/plate, respectively; *** $P \leq 0.001$). Hence, depletion of C/EBP β expression partially inhibited the anchorage-independent growth of GL261 cells.

C/EBP β depletion inhibits glioblastoma motility and invasion

The ability of glioblastoma cells to invade into normal surrounding tissue is influenced by their motility as well as ability to penetrate through tissue barriers such as extracellular matrix. To assess the role of C/EBP β in glioblastoma cell motility, we used “scratch-wound” assays. These assays showed that both murine GL261 cells and human LN18 cells depleted of C/EBP β did not fill in a scratch as rapidly as cells treated with a control RNA duplex, suggesting decreased cell motility (Fig. 3A). To further substantiate these findings, we also assessed glioblastoma cell motility using Transwell chambers. In these assays, control cells and cells depleted of C/EBP β are replated into Transwell chamber membranes coated with Matrigel at the same density and 48 h later the numbers of cells that have crossed the chamber membrane are counted. Depletion of C/EBP β in GL261 cells (I4 and I5 pools) resulted in a significant decrease in the number of cells that crossed the Matrigel-coated membranes, indicating a true decrease in motility and invasive ability (Fig. 3B).

To further analyze the mechanism involved in the stimulatory effect of C/EBP β on GL261 glioblastoma cells, we studied the expression of genes implicated in these processes. To this end we screened two arrays of cell cycle and cancer-related genes. As shown in Table 1, among other, we found a number of genes involved in the DNA damage response, such as ATM, Brca1, Brca2, Chk1, Chk2, and p27, that were significantly up-regulated in the I4 C/EBP β -deficient cells (Table 1). In contrast, we found that the expression of a substantial number of genes involved in adhesion invasion, and metastasis, including integrin $\alpha 3$, melanoma cell adhesion molecule, plasminogen activation urokinase receptor, and S100 calcium binding protein A4, was down-regulated in I4 cells. Interestingly we also found four genes, Mcam1, Plaur, integrin beta 3 and vascular endothelial growth factor C, which have been implicated in promoting angiogenesis. We next assessed these C/EBP β -induced changes of the expression of the genes involved in the DNA damage response at the protein level. We found that, according with the PCR-array data, the abundance of all of them was significantly increased in the interfered lines (Fig. 4), suggesting that the observed effects of C/EBP β interference could be mediated by its effects upon the G0/G1 checkpoint, and an impairment in the progression through the cell cycle with a concomitant inhibition of glioblastoma progression.

Knockdown of C/EBP β inhibits the growth of GL261 glioma cells *in vivo*

Based on the above *in vitro* findings, C/EBP β appears to be important in the growth of glioblastoma cells. To investigate whether the effects of C/EBP β knockdown on glioblastoma growth inhibition are sustained *in vivo*, we next orthotopically implanted GL261 glioma cells into mice brains to generate tumors. The murine glioma GL261 model has been the most common used syngeneic transplant model for both s.c. and intracranial experimental

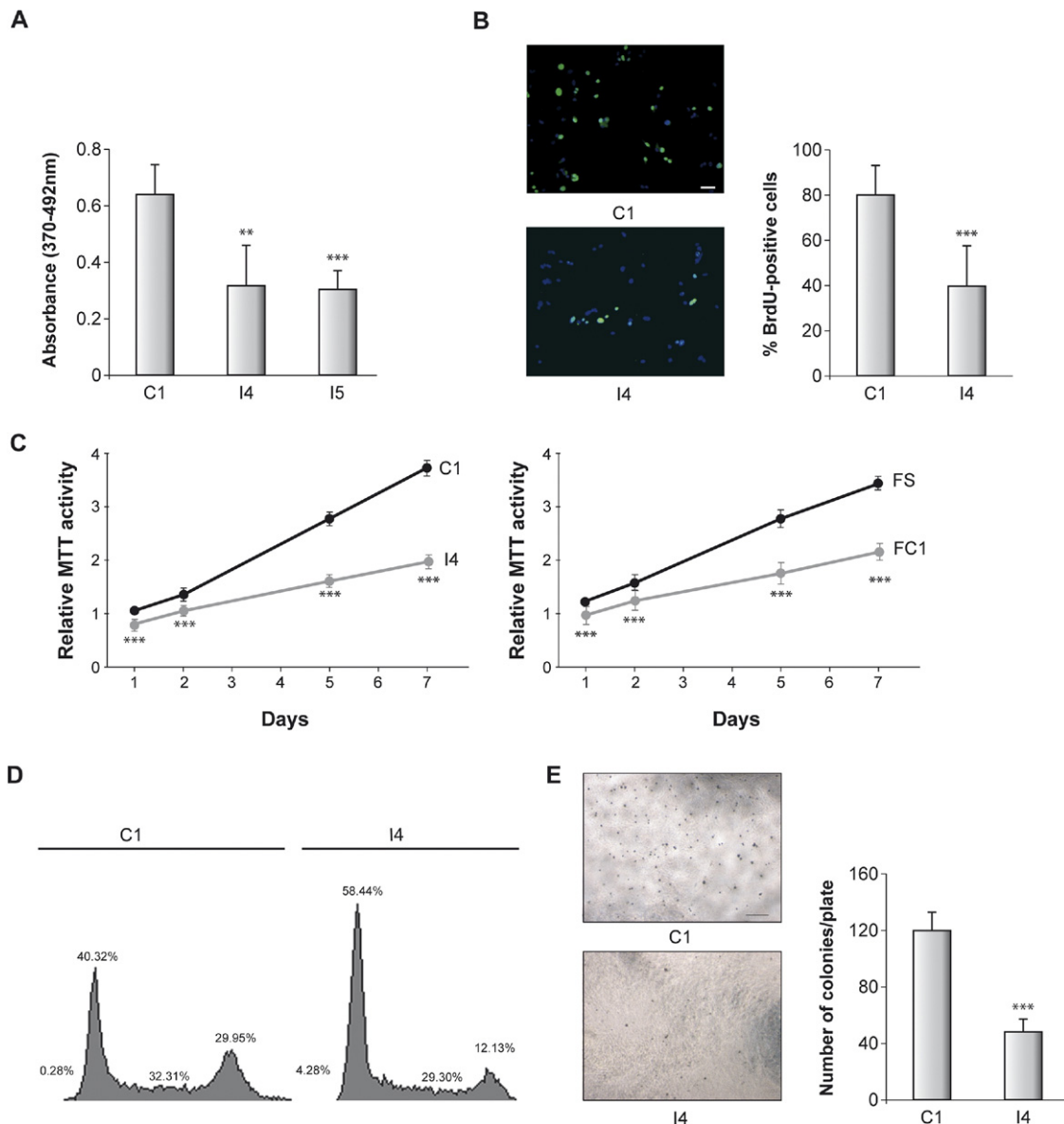


Fig. 2. Effect of C/EBP β depletion on cell viability, proliferation, and clonogenicity. (A) C1, I4 and I5 pools were seeded into individual wells of a 96-well plate and cultivated for 24 h after which BrdU was added to the culture medium. Cells were harvested 16 h after BrdU addition. (B) Cells were grown on glass cover slips for 24 h and BrdU incorporation was analyzed 16 h after by immunofluorescence using a specific anti-BrdU antibody. Bar scale, 50 μ m. Quantification of the results is shown in the right panel. Indicated is the percentage of BrdU⁺ cells. (C) Murine C1 and I4 and human FS and FC1 cells were seeded in a 96-well plate and at different times after plating cell viability was determined by the MTT assay. (D) Progression through the cell cycle was analyzed by PI staining and FACS analysis. Curves modeling the G0/G1, S, and G2/M compartment, derived by using the Summit program, are shown. Data are representative of three independent experiments. (E) Three weeks after seeding the cells in soft agar, 10 randomly selected microscopic fields were counted. Shown are representative microphotographs (bar scale 250 μ m) and quantification. Values in panels A, B, C and E represent the means \pm SD of at least three different experiments. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

glioma tumors (Miyatake et al., 1997; Kjaergaard et al., 2000; Edwards et al., 2002). This particular intracranial animal model recapitulates many of the histopathological and biological features of human glioma including both necrosis with pseudopalisading and invasion of the brain adjacent to tumor as isolated single cells and as group of cells around vascular channels (Zagzag et al., 2003). To control for equal tumor loading, we monitored tumor growth *in vivo* by MRI at different times after implantation.

Mice injected with C/EBP β -deficient cells also showed a delayed onset and progression of tumors compared to C1 controls and tumor volume, as assessed by T₁-weighed images after gadolinium contrast administration, revealed a significant reduction in tumor volume in mice implanted with C/EBP β -deficient I4 cells (Fig. 5A, B). About 85% reduction in tumor volume was observed in I4-derived tumors at 15 days post-injection. This strong reduction in the tumor growth potential induced by C/EBP β interfer-

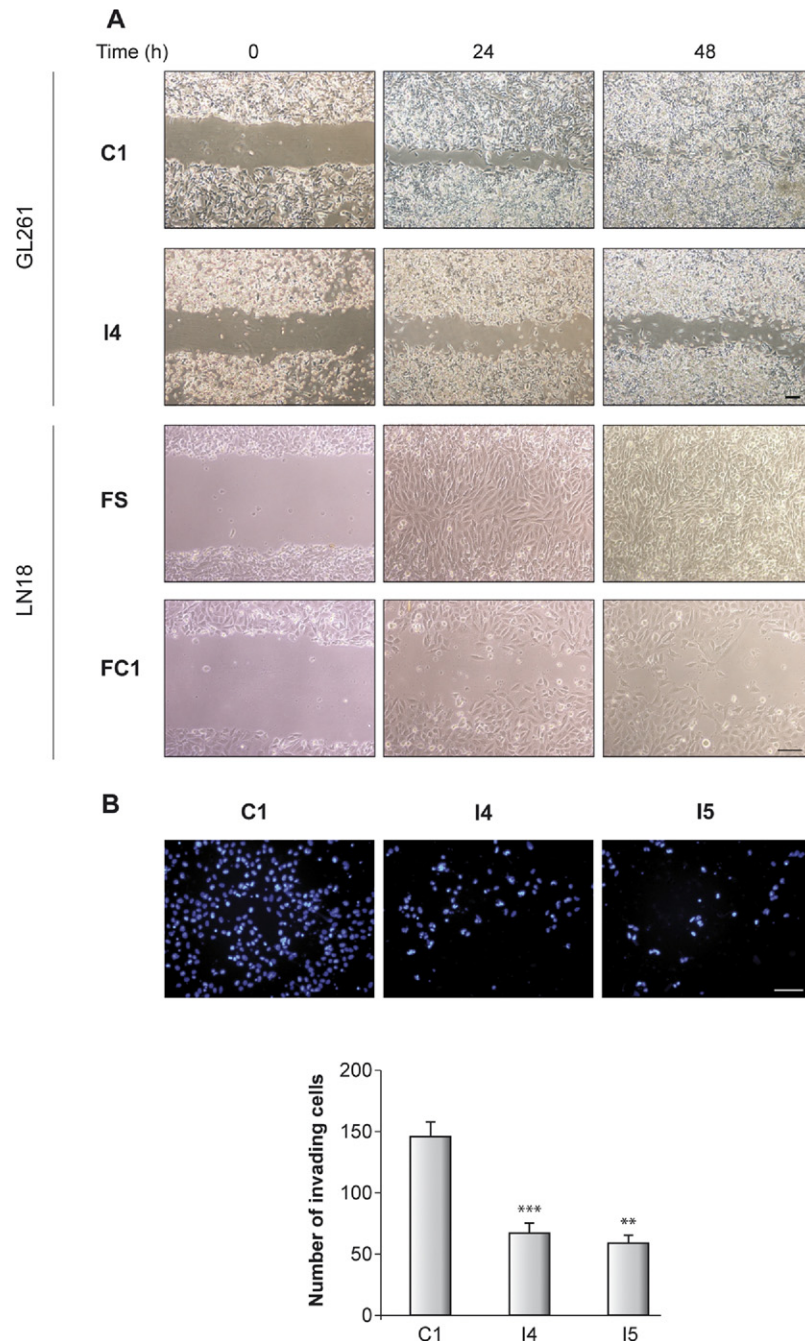


Fig. 3. Effects of C/EBP β on cell motility and invasion. (A) Murine C1 and I4 and human FS and FC1 cells were grown to confluence into a monolayer and a linear scratch wound was performed with a plastic pipette tip. Images were taken with a phase contrast microscope at different times after wounding. Representative phase-contrast images of the *in vitro* wound-healing assay are shown. Bar scale, 100 μ m. (B) Cell invasion was measured on transwell coated with Matrigel as described in Experimental procedures. Values are represented as means \pm SD of three different experiments. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

ence was maintained over time. Both the log-rank test and Kaplan–Meier analysis of the survival data demonstrated a significant survival advantage for the C/EBP β low expression glioma-bearing mice when compared to their matched C/EBP β high expression parental glioma-bearing animals (Fig. 5C). Log-rank analysis of the data yielded a *P* value of 0.0012. Mice injected with I4 cells presented a significant increase in the mean survival (41 vs. 26.5 days).

Because the C/EBP β -deficient tumors arose at a later time point, we anticipated that they would differ histologically and possibly also in terms of malignancy. Here, a difference between C1- and I4-derived tumors became apparent. Although both I4 and C1 pools gave rise to gliomas, which according to pathologists could be classified as grade IV glioblastoma, C/EBP β -deficient tumors did not show blood vessels formation or multinucleated giant

Table 1. Effect of C/EBP β on cancer regulatory gene expression

mRNA	I4/C1 (mean of fold change)
Apaf1 (Apoptotic peptidase activating factor 1)	4.82
Atm (Ataxia telangiectasia mutated)	6.41
Brca1 (Breast cancer 1)	1.91
Brca2 (Breast cancer 2)	6.45
Cdkn1b (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, p27)	3.51
Chk1 (Checkpoint kinase 1)	3.46
Chk2 (Checkpoint kinase 2)	1.61
Itga3 (Integrin alpha 3)	0.40
Itgb3 (Integrin beta 3)	0.32
Mcam1 (Melanoma cell adhesion molecule)	0.53
Plaur (Plasminogen activator, urokinase receptor)	0.47
S100A4 (S100 Calcium binding protein A4)	0.04
Vegfc (Vascular endothelial growth factor C)	0.50

cells, typical features of aggressive grade IV glioblastomas (Fig. 5D). Also, we did not detect necrosis areas in tumors derived from I4 cells, in comparison with C1-derived tumors, 18 days after injection. In addition, the PCNA labeling, a measure of proliferation, of I4-derived tumors, was significantly less than that of the C1 tumors (Fig. 5E), again suggesting a growth-suppressing action of C/EBP β on tumor cells *in vivo*.

DISCUSSION

Glioblastoma multiforme is the most common form of brain tumor occurring in adults. This devastating disease is usually incurable and patients have a mean survival time of approximately 1 year after diagnosis (Benedetti et al., 2000; DeAngelis, 2001). Here, we show that C/EBP β has a role in promoting glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. The C/EBP β gene has been shown to promote both growth arrest and increased proliferation in a context-specific manner. How it stimulates mitotic growth and why it elicits completely opposite effects on proliferation in different cellular contexts remains to be ascertained. In this study, we show for the first time that depletion of C/EBP β expression suppresses glioma cell growth *in vitro* and glioma tumor growth *in vivo*. This was accompanied by a regulation of the expression of different genes involved in DNA damage response and in invasion and metastasis. Collectively, our findings suggest that C/EBP β might play an important role as a growth regulator in high-grade gliomas opening out a new role for C/EBP β in the pathogenesis of central nervous system tumors.

We have focused our work on the study of the oncogenic role of C/EBP β in glioma. We have found that a high C/EBP β level is a poor prognosis marker, supporting that C/EBP β is acting as an oncogenic factor in glioblastomas and has an important role in their progression. Although C/EBP α , another member of the C/EBP family, has emerged as a clear negative regulator of cell proliferation in many cellular contexts raising the possibility that could function as a tumor suppressor (Schuster and Porse, 2006), the function of C/EBP β upon proliferation, in situations where the function of C/EBP α is straightforward, is

more complex. Several data suggested that C/EBP β might work as an anti-proliferative agent. C/EBP β , similarly to C/EBP α , is able to suppress cell proliferation through repression of E2F target-genes in a manner dependent on members of the retinoblastoma protein family (Sebastian et al., 2005). Also, C/EBP β expression has been associated with growth arrest of keratinocytes (Zhu et al., 1999) and induction of cell cycle exit induced by Ras^{V12} in primary cells (Hanlon and Sealy, 1999; Shuman et al., 2004). However, and in agreement with our results, other studies have suggested a growth-promoting activity for C/EBP β . Zhu et al. (Zhu et al., 2002) have shown that C/EBP β ^{-/-} mice are completely refractory to skin tumorigenesis induced by the carcinogen 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene, that produce oncogenic ras mutations in epidermal keratinocytes, suggesting an important role for C/EBP β in keratinocytes survival in response to oncogenic ras and in skin tumorigenesis (Sterneck et al., 2006). C/EBP β also functions as a survival factor in myc/ras transformed macrophages *in vitro* (Wessells et al., 2004) and in Wilms tumor cells (Li et al., 2005) and has been associated with ovarian tumor progression (Sundfeldt et al., 1999).

Here, we show that C/EBP β exerted a stimulatory effect on murine and human glioblastoma cell proliferation and viability *in vitro*. Inhibition of C/EBP β expression leads to G1 arrest and reduced S phase in GL261 cells. These effects are accompanied by an increase in the expression of several genes involved in the DNA damage response, such as ATM, Brca1, Brca2, Chk1, Chk2, and p27, thereby ensuring a non-proliferative outcome. These results provide support for the possibility that depletion of C/EBP β inhibits cell proliferation and survival in glioblastoma cells by directly affecting the expression of these genes resulting in an activation of the G0/G1 checkpoint, and impairment in the progression through the cell cycle and consequently an inhibition of glioblastoma progression *in vivo*. Consistent with this proposal, the regulatory regions of all these genes present consensus binding sites for C/EBP β , suggesting that this protein can indeed directly regulate

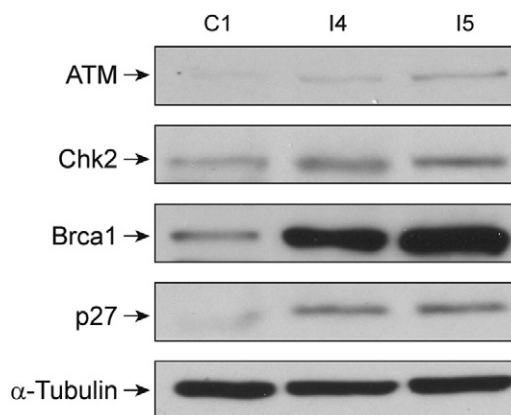


Fig. 4. Western blot analysis. Protein lysates from C1, I4, and I5 pools were used for Western blot analysis using specific antibodies against ATM, chk2, Brca1, and p27, as indicated in Experimental procedures.

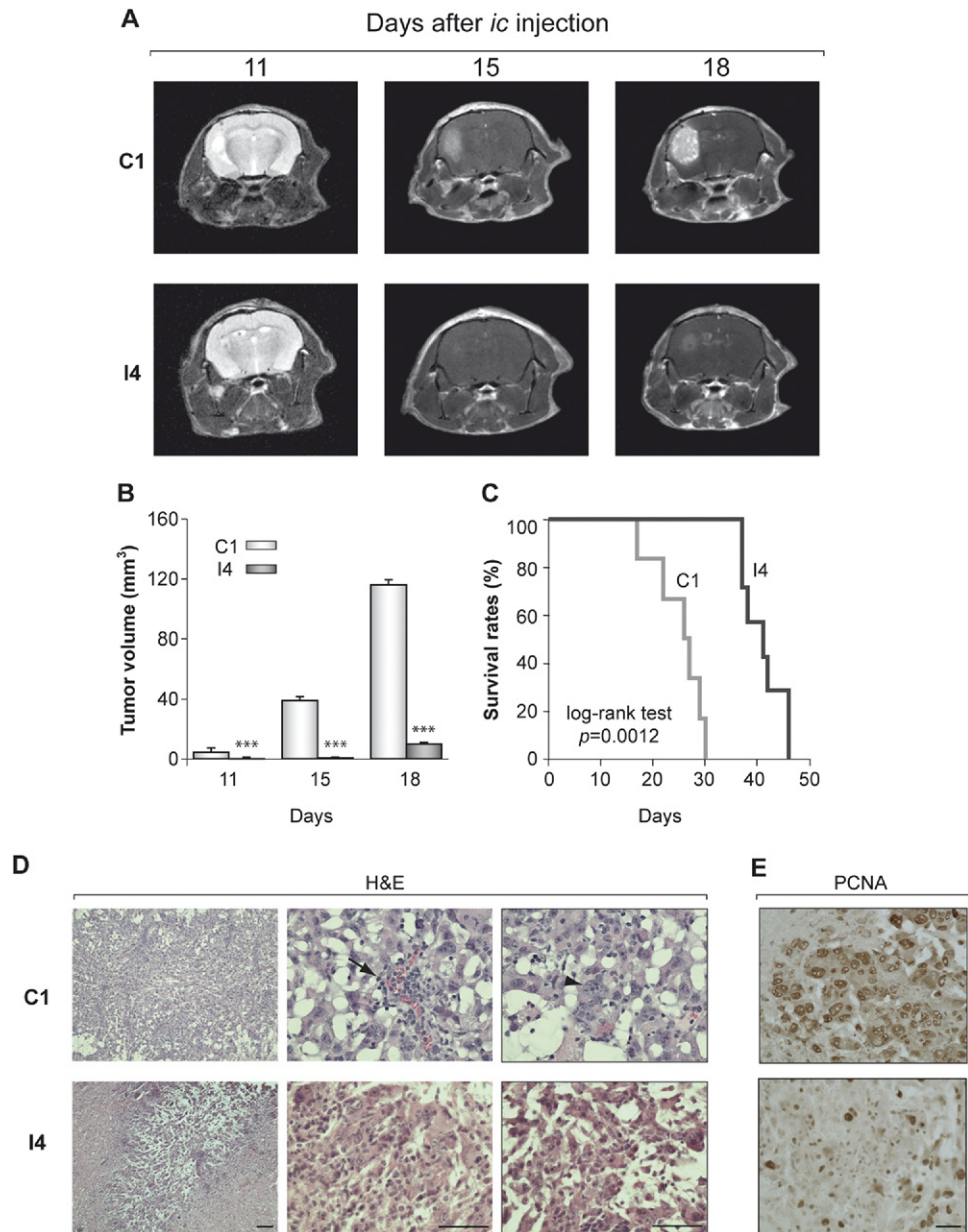


Fig. 5. Effects of *C/EBPβ* expression on tumor growth *in vivo*. Histological and immunostaining analysis of tumors induced by GL261-derived pools. (A) T_1 magnetic resonance imaging (MRI) pictures obtained from mice injected with the GL261-derived clones. T_1 -weighted imaging was performed at 7 Tesla as described in Experimental procedures at different times after injection. Coronal images showing the brains of representative mice, obtained at 11, 15, and 18 d post-injection are presented. (B) Quantitative analysis of total tumor volumes. Values represent the mean \pm SD from five different animals. (C) Kaplan–Meier plots and log-rank statistics analysis of overall survival reveal that down-regulation of *C/EBPβ* expression in I4 tumors significantly improves survival of tumor-bearing mice compared with their C1 controls (log-rank test $P=0.0012$). (D) Representative hematoxylin and eosin staining images of the C1- and I4-derived tumors. Middle and right panels show higher magnifications of the images shown in the two left panels. C1 tumors showed clear blood vessels (arrows) and multinuclear giant cells (arrowheads). Scale bars, 100 μ m. (E) Immunocytochemistry analysis of tumor sections for PCNA detection. Scale bar, 25 μ m.

their expression. Also, and in agreement with our results, it has been shown that overexpression of *C/EBPβ* in a human mammary epithelial cell line leads to anchorage-independent growth and invasive properties (Bundy and Sealy, 2003). We show here that a decrease in *C/EBPβ* expression leads to an inhibition of colony growth in soft agar, suggesting that *C/EBPβ* plays a role in the oncogenic process of anchorage-independence and is critical for tu-

mor growth in glioblastoma. In this regard, results from the PCR array analysis also show that *C/EBPβ* depletion decreases the mRNA levels of different genes involved in invasiveness and metastasis, including integrin $\alpha 3$, melanoma cell adhesion molecule, plasminogen activation urokinase receptor, and S100 calcium binding protein A4, suggesting that the induction of these genes by *C/EBPβ* could mediate its effects on these processes.

Notably, it has recently been demonstrated that expression of C/EBP β is markedly increased in high-grade glioma compared with low-grade glioma, and patients whose expression of C/EBP β in tumor tissue was lower survived longer than those whose expression was higher (Homma et al., 2006). These results are consistent with our data showing that C/EBP β knockdown inhibited glioblastoma tumor growth *in vivo*. Consequently, tumor development was significantly delayed in mice injected with 14 cells. Our data clearly show that those mice bearing GL261 cells with high C/EBP β expression had poorer survival than mice bearing C/EBP β -deficient tumors ($P=0.0012$). Moreover, C/EBP β -silenced glioblastoma lacked the aggressiveness of control tumors, including enhanced blood vessel formation and abundance of giant cells, suggesting that in addition to proliferation, C/EBP β signaling is also an effective regulator of malignant transformation in glioblastoma cells *in vivo*. The reduced vascularisation observed in those mice implanted with C/EBP β knockdown cells, could be due, at least in part, to the down-regulation by this transcription factor of several genes involved in the promotion of angiogenesis. This lends support to the view that dysregulated C/EBP β expression could influence glioblastoma development. Our results are supported by a recent paper demonstrating that expression of C/EBP β is linked to the mesenchymal state of primary glioblastoma and provides an excellent prognostic biomarker for tumor aggressiveness (Carro et al., 2010).

CONCLUSION

In conclusion, our study demonstrates that C/EBP β is a crucial regulator of glioblastoma cell growth and transformation and that several genes involved in DNA repair, invasion and metastasis may be important downstream effectors of C/EBP β -mediated oncogenic properties. These findings are clinically relevant because advanced-stage glioblastomas are refractory to current treatments; thus, understanding C/EBP β regulation of tumor growth potential, could provide a novel therapeutic adjunct for aggressive glioblastomas.

Acknowledgments—This work was supported by the Ministerio de Educacion y Ciencia grant SAF2007-62811 (to A.P.-C). CIBERNED is funded by the Instituto de Salud Carlos III. D.A.-M is a fellow of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. We would like to thank Dr. J. Dorado for his help with the flow cytometry analysis. We also thank Dr. Quintanilla-Martinez (Institute of Pathology, German Research Center for Environmental Health, Germany) for providing the shC/EBP β lentiviral plasmid.

REFERENCES

- Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER (1994) C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 76:1099–1114.
- Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, Galli R, Selleri S, Di Meco F, De Fraja C, Vescovi A, Cattaneo E, Finocchiaro G (2000) Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* 6:447–450.
- Bottomley PA (1987) Spatial localization in NMR spectroscopy *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci* 508:333–348.
- Buck M, Turler H, Chojkier M (1994) LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation. *EMBO J* 13:851–860.
- Bundy LM, Sealy L (2003) CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP β)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 22:869–883.
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, Lasorella A, Aldape K, Califano A, Iavarone A. (2010) The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463:318–325.
- Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A (2008) CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 121:1224–1234.
- Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A (2002) CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277:5460–5467.
- Cortes-Canteli M, Wagner M, Ansorge W, Perez-Castillo A (2004) Microarray analysis supports a role for CCAAT/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem* 279:14409–14417.
- DeAngelis LM (2001) Brain tumors. *N Engl J Med* 344:114–123.
- Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res* 62:4671–4677.
- El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS (2006) Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54:526–535.
- Fomchenko EI, Holland EC (2006) Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 12:5288–5297.
- Hanlon M, Sealy L (1999) Ras regulates the association of serum response factor and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem* 274:14224–14228.
- Hennig J, Nauwerth A, Friedburg H (1986) RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3:823–833.
- Homma J, Yamanaka R, Yajima N, Tsuchiya N, Genkai N, Sano M, Tanaka R (2006) Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein beta correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* 15:595–601.
- Kjaergaard J, Tanaka J, Kim JA, Rothchild K, Weinberg A, Shu S (2000) Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res* 60:5514–5521.
- Li W, Kessler P, Yeger H, Alami J, Reeve AE, Heathcott R, Skeen J, Williams BR (2005) A gene expression signature for relapse of primary Wilms tumors. *Cancer Res* 65:2592–2601.
- Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sanchez-Galiano S, Morales-Garcia JA, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A (2007) NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci* 27:5766–5776.
- Menard C, Hein P, Paquin A, Savelson A, Yang XM, Lederfein D, Barnabe-Heider F, Mir AA, Sterneck E, Peterson AC, Johnson PF, Vinson C, Miller FD (2002) An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36:597–610.
- Miyatake S, Martuza RL, Rabkin SD (1997) Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma. *Cancer Gene Ther* 4:222–228.
- Nadeau S, Hein P, Fernandes KJ, Peterson AC, Miller FD (2005) A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci* 29:525–535.

- Paxinos G, Franklin K (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Pignatelli M, Cortes-Canteli M, Lai C, Santos A, Perez-Castillo A (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. *J Cell Sci* 114:4117–4126.
- Poli V (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279–29282.
- Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561–575.
- Rask K, Thorn M, Ponten F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, Enerback S (2000) Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBPbeta) and C/EBPzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int J Cancer* 86:337–343.
- Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, Sterneck E (1998) The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev* 12:1907–1916.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G (1995) Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J* 14:1932–1941.
- Schuster MB, Porse BT (2006) C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues? *Biochim Biophys Acta* 1766:88–103.
- Seagroves TN, Krnacik S, Raught B, Gay J, Burgess-Beusse B, Darlington GJ, Rosen JM (1998) C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* 12:1917–1928.
- Sebastian T, Malik R, Thomas S, Sage J, Johnson PF (2005) C/EBP-beta cooperates with RB: E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *EMBO J* 24:3301–3312.
- Shuman JD, Sebastian T, Kaldis P, Copeland TD, Zhu S, Smart RC, Johnson PF (2004) Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12. *Mol Cell Biol* 24:7380–7391.
- Sterneck E, Johnson PF (1998) CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem* 70:2424–2433.
- Sterneck E, Zhu S, Ramirez A, Jorcano JL, Smart RC (2006) Conditional ablation of C/EBP beta demonstrates its keratinocyte-specific requirement for cell survival and mouse skin tumorigenesis. *Oncogene* 25:1272–1276.
- Sundfeldt K, Ivarsson K, Carlsson M, Enerback S, Janson PO, Brannstrom M, Hedin L (1999) The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary *in vivo*: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer* 79:1240–1248.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813–818.
- Tkac I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) *In vivo* 1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41:649–656.
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246:911–916.
- Wessells J, Yakar S, Johnson PF (2004) Critical prosurvival roles for C/EBP{beta} and insulin-like growth factor I in macrophage tumor cells. *Mol Cell Biol* 24:3238–3250.
- Zagzag D, Miller DC, Chiriboga L, Yee H, Newcomb EW (2003) Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion *in vivo*. *Brain Pathol* 13:34–37.
- Zhu S, Oh HS, Shim M, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC (1999) C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19:7181–7190.
- Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC (2002) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:207–212.

Cancer stem cells and brain tumors

Ana Pérez-Castillo · Diana Aguilar-Morante · José A. Morales-García · Jorge Dorado

Received: 14 February 2008 / Accepted: 19 March 2008

Abstract Besides the role of normal stem cells in organogenesis, cancer stem cells are thought to be crucial for tumorigenesis. Most current research on human tumors is focused on molecular and cellular analysis of the bulk tumor mass. However, evidence in leukemia and, more recently, in solid tumors suggests that the tumor cell population is heterogeneous. In recent years, several groups have described the existence of a cancer stem cell population in different brain tumors. These neural cancer stem cells (NCSC) can be isolated by cell sorting of dissociated suspensions of tumor cells for the neural stem cell marker CD133. These CD133⁺ cells –which also express nestin, an intermediate filament that is another neural stem cell marker– represent a small fraction of the entire brain tumor population. The stem-like cancer cells appear to be solely responsible for propagating the disease in laboratory models. A promising new approach to treating glioblastoma proposes targeting cancer stem cells. Here, we summarize progress in delineating NCSC and the implications of the discovery of this cell population in human brain tumors.

Introduction

The cancer stem cell hypothesis proposes that cancers derive from a small fraction of cancer cells that constitute a reservoir of self-sustained cells with the exclusive ability to self-renew and maintain the tumor. There is increasing evidence that malignant tumors such as leukemias, breast cancers, and brain cancers contain cells that maintain the characteristics of tissue-specific stem cells. These stem-like tumor cells are bestowed with dysregulated potential for self-renewal, excessive proliferation, and aberrant differentiation into a heterogeneous progeny of cancer cells culminating in the intratumor heterogeneity. Rapidly accumulating evidence from various laboratories indicates that in several forms of human cancer, only a minority subpopulation of cancer cells are able to form new tumors when transplanted into immunodeficient mice. The population of cells selectively endowed with tumorigenic capacity can be purified from whole tumor tissues by virtue of a surface marker expression profile and is defined as the “cancer stem cell” population. Cancer stem cells have been identified from various solid tumors, including breast (CD44⁺ and CD24^{−/low}), colorectal (CD133⁺), ependymoma (CD133⁺, nestin⁺, and BLBP⁺), and glioblastoma (CD133⁺) [1–4]. An intense debate is ongoing as to whether cancer stem cells originate from adult stem cells or from mature, committed progenitors and/or even terminally differentiated cells that have abnormally acquired self-renewal capacity [2]. It is also suggested that niche cells could be a primary target for carcinogenic insult to adult stem cells, thereby inciting a tumorigenic response [5]. Thus, the molecular mechanisms underlying the genesis of cancer stem cells remain obscure, and identifying unique cell-surface markers for cancer stem cell isolation could provide new tools to address these questions and allow for further molecular and functional characterizations.

High-grade gliomas, which include glioblastoma

Q1 Keywords

Ana Pérez-Castillo (✉) · Diana Aguilar-Morante ·
José A. Morales-García · Jorge Dorado
Instituto de Investigaciones Biomédicas
CSIC-UAM and Centro de Investigación Biomédica en Red
sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)
Arturo Duperier, 4
28029 Madrid, Spain
e-mail: aperez@iib.uam.es

(GBM) and anaplastic astrocytoma, are among the most common intrinsic brain tumors in adults and are nearly uniformly fatal. Whereas there has been progress in understanding the molecular genetics of these tumors [6], the cell types of origin are still uncertain, and the molecular determinants of disease aggressiveness are not well understood. A better understanding of the cellular origin and molecular pathogenesis of these tumors may identify new targets for treating these neoplasms. Until recently, GBMs were presumed to arise from glial cells residing within the brain parenchyma. However, recent evidence suggests that neural stem cells can be an alternate cellular origin of gliomas [7–9]. In fact, recent evidence demonstrates that neural stem cells can give rise to neoplasms that recapitulate the histopathological hallmarks of human gliomas [10, 11].

Adult neural stem cells are cells in the adult nervous system that can self-renew and differentiate into all types of neural cells, including neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [12]. In the adult human forebrain, the majority of neurons are created by the early postnatal period. However, it has been demonstrated that neurons continue to arise in two niches of the adult brain: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus [13, 14]. In the hippocampus, granule neurons arise in the SGZ of the dentate gyrus. Progenitor cells in the SVZ migrate to the olfactory bulb (OB) through the rostral migratory stream (RMS), where they differentiate into granule and periglomerular neurons of the OB (Fig. 1). Both cell-extrinsic and cell-intrinsic factors have been shown to influence maintenance and regulation of the neurogenic system in vivo [15]. A number of factors, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), and basic fibroblast growth factor (bFGF), have been shown to affect proliferation and differentiation of precursor-cell populations [16, 17]. This population of neural stem cells has distinct features such as the capacity of self-renewal, multipotency, asymmetric division, and express characteristic markers such as nestin, a cytoskeletal protein; CD133, a cell-surface marker of normal neural stem cells; and Notch. The demonstration that the adult human brain contains an abundant source of neural stem cells and that GBMs contain tumorigenic neural stem-like cells indicate that neural stem cells are a plausible origin of human gliomas. This has given rise to speculation that more effective therapies will result from approaches aimed at targeting the stem-cell-like component of GBM [18–21].

Glioblastoma tumor stem cells possess the capacity to self-renewal that leads to daughter cells with the same predisposition for replication as the parental cells, as well as the capacity to recapitulate the generation of a growing tumor [22]. These capacities have been shown for CD133⁺ cells isolated from glioblastoma [23]. A small number of CD133⁺ cells are sufficient for formation of glioblastoma in immunodeficient mice. The resulting primary xenograph

consisting of a minority of CD133⁺ cells and a majority of CD133⁺ cells is a phenocopy of the patient's tumor [2].

In addition to possessing the fundamental stem cell properties of self-renewal and multipotency, glioblastoma stem cells share other characteristics with neural stem cells. They were first isolated from tumors by virtue of CD133 expression, which marks neural stem and progenitor cells [2]. The similarities in gene expression suggest that common cell-signaling systems might operate in normal and malignant neural stem cells. These phenotypic and functional similarities suggest that glioblastoma stem cells might arise from normal neural stem cells that retain self-renewal properties but acquire mutations necessary for tumorigenicity. Indeed, deletion of *Nf1* and *Trp53* from neural stem cells in mice initiates gliomagenesis in the SVZ, where neural stem cells reside [9]. However, whether human glioblastoma stem cells arise from mutated neural stem cells or a more mature cell type that acquires self-renewal capacity remains to be determined.

The stem cell niche

It has been long recognized that normal stem cells of various tissues are tightly regulated by the immediate microenvironment, or stem cell niche [24]. Consequently, an important question is whether glioblastoma stem cells also depend on cues from the environment for survival. Stem cell niches are not merely repositories for stem cells but are complex dynamic entities that actively control stem cell function [25] regulating stem cell renewal and fate. This microenvironment of stem cells is known to help maintain the cells in a quiescent state and preserve their potential to proliferate and differentiate [26, 27]. Direct genetic alterations or dysregulated crosstalk between signaling pathways of the cancer stem cells (CSCs) and cells of their microenvironment have been implicated as important determinants of functional tumor microenvironment preceding cancer development [28, 29].

As commented upon in the “Introduction,” studies conducted over recent years have identified stem cells with regenerative capacity in the SVZ and the SGZ of the dentate gyrus. The central structural element of the neural stem cell niche is provided by capillaries within those zones. This organization places the stem cells in close proximity with endothelial and other vascular cells, facilitating communication among these cell types. The existence of niches extends to tumor cells as well. The tumor microenvironment, composed of nonepithelial stromal cells, is increasingly shown to be essential for tumor growth (Fig. 2) [30]. Neural cancer stem cells (NCSC) have been shown to lie within a vascular microenvironment. In this regard, Calabrese et al. recently provided convincing evidence that stem cells from various brain tumors, including glioblastoma, are indeed maintained within vascular niches that mimic the neural stem cell niche [31]. Using coimmunofluorescence and

multiphoton laser scanning microscopy, they showed first that CD133⁺/nestin⁺ tumor cells are closely associated with vasculature. Furthermore, increasing the number of endothelial cells and blood vessels in xenografts augmented the NCSC population and the rate of tumor growth. Clinical trials of the antiangiogenic drug bevacizumab [32] have demonstrated a potent antitumor effect in patients with glioblastoma. This effect could be the result of a depletion of the tumor blood supply. However, the presence of a glioblastoma stem cell niche would imply that this drug might also function to disrupt stem cell maintenance. In this regard, Calabrese and colleagues showed that treating glioblastoma-bearing mice with bevacizumab depleted tumor blood vessels and caused a significant reduction both in the NCSC population and tumor growth rate. Interestingly, this treatment did not alter the proliferation or survival of most of the tumor cells, suggesting that the drug was specifically acting on the cancer stem cells.

The notion that cancer stem cells exist in aberrant cell niches is an attractive one. A recent study of human gliomas suggests that bone morphogenic proteins (BMPs), which are niche-derived regulators of neural stem cell fate, might also regulate the differentiation status of cancer stem cells [33]. Therefore, the tumor microenvironment offers a novel approach to treatment through the targeting of cells inside the tumor niche.

Identifying glioblastoma stem cells

Correctly identifying stem cells *in vivo* remains the biggest obstacle to progress in understanding stem cell biology. Identification of reliable markers will allow prospective isolation and characterization of a pure population of CSCs, not just a population of cells containing CSCs. Normal stem cells and their neighboring cells within tissues can rarely be located by histological methods. Some properties that have been widely assumed to mark stem cells, such as preferential bromodeoxyuridine (BrdU) label retention (caused by an expected tendency of stem cells to divide more slowly than many of their progeny), have frequently proven to be unreliable without the use of other markers [34–36]. The “side population” (SP) is defined by Hoechst dye exclusion in flow cytometry and has been commonly used as one of the methods of enriching for cancer stem cells in glioblastomas [37] as well as in other types of tumor cells. Goodell et al. and Hirschmann-Jax et al. demonstrated that the exclusion of Hoechst 33342 dye by SP cells is a dynamic process involving multidrug-resistance transporter 1 (MDR1), a member of the adenosine-triphosphate-binding cassette (ABC) transporter transmembrane proteins [38, 39]. However, MDR1 cannot be taken as a single marker to identify and isolate SP cells, and additional transporters should be analyzed.

Much work has been carried out on brain tumor stem cells enriched by the cell-surface marker CD133. It is un-

clear at this time whether the SP overlaps with the CD133 population, but both markers have been shown to be highly enriched in neurosphere-forming capacity [40, 41], one of the defining characteristics of neural stem cells and progenitors (Fig. 3). Recently, several groups have isolated NCSC from glioblastomas [7]. They cultured dissociated tumor samples and expanded the cells on a defined, serum-free medium containing fibroblast growth factor and epidermal growth factor. These cells form floating aggregates (neurospheres), just as normal neural stem cells do in the same conditions. These neurospheres retain the self-renewing capacity and expressed neural stem cell markers, such as nestin, CD133, and Notch. Such aggregates, highly enriched in long-term, self-renewing multipotent cells *in vitro*, formed malignant tumors when transplanted *in vivo* in immunodeficient mice. These findings indicate that glioblastomas contain cancer-initiating neural stem-like cells, which can be identified by their staining with CD133 [2, 7]. Furthermore, it has been recently shown that CD133 expression correlates with survival in patients with gliomas, lending support to the current cancer stem cell hypothesis [42]. These authors found, using a large panel of human glioma samples, frequencies of CD133⁺ cells to increase with tumor grade, with many glioblastomas containing > 25% positive cells. In contrast, tissue sections of many World Health Organization (WHO)-grade tumors were devoid of immunoreactive cells, probably indicating a low frequency of CSCs in these less malignant tumors. These findings provide strong and valuable evidence for the CSC hypothesis and the clinical relevance of the CD133⁺ cell population in glioblastomas.

Another important trait of brain tumor stem cells is the signaling through Notch receptor. Notch signaling is strongly activated in primary human gliomas and in several glioma cell lines [43] where its depletion reduces tumor proliferation [44]. Moreover, transfection of downstream mediators of the Notch pathway results in an increase in the growth and sphere formation of human glioma CD133⁺ cells, indicating that Notch signaling is essential for maintenance and proliferation of the tumor stem cell population [45]. A similar effect has been observed in medulloblastoma stem cells, where loss of tumor-forming capacity is attributed to depletion of cancer stem cells in response to Notch signaling blockade [46]. These data are in agreement with the studies in nonneoplastic stem cells that attribute to Notch signaling the role of inhibiting neuronal differentiation and maintaining the neural progenitor pool [47].

Neural cancer stem cells as therapeutic targets

Primary malignant brain tumors are characterized by a short median patient survival and almost 100% tumor-related mortality. Therefore, this brain tumor remains one of the most lethal forms of human cancer. Glial neoplasms are

the most frequent primary intracranial neoplasms in humans, accounting for > 60% of all primary brain tumors. Although glioblastomas, the most malignant of these, rarely spread outside the nervous system, they infiltrate crucial structures in the brain, preventing curative surgical resection. Radiation and chemotherapy offer only modest benefits and remain essentially palliative [48].

Conventional chemotherapy and/or radiation therapies are not usually designed to target a specific cell subpopulation, and their clinical efficacy is measured by their capacity to induce regression of bulk tumor lesions. It is therefore difficult to know whether traditional antitumor treatments are able to target cancer stem cells, which are thought to be resistant to such treatments [49, 50]. If glioblastomas are maintained by NCSCs, cells that are characterized by low rates of division and proliferation, it is clear that therapies such as chemotherapy or radiation, which target actively cycling cells, are doubtful to be effective. Therefore, it is unlikely that existing treatments will ever cure most patients with glioblastoma. Thus, the concept of cancer stem cells provides an interesting conceptual framework to interpret the phenomenon of tumor relapse as well as the heterogeneity found inside tumors in terms of aberrant cell proliferation and differentiation [51].

Cancer treatment has traditionally been based on the implicit assumption that human cancer populations are homogeneous. Cancer is resilient to treatment because malignant cells survive chemotherapy and radiation or avoid immune surveillance of endogenous cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells. As cancer stem cells have a capacity for unlimited self-renewal and the ability to initiate and drive tumor progression in an animal model [2, 4] they would seem the most probable candidates responsible for tumor chemoresistance and recurrence.

In fact, recent investigations in the field of brain and breast cancers implicate cancer stem cells in radiation resistance [50, 52, 53]. Bao et al. demonstrated that radiation resistance in highly malignant gliomas (GBM) is most likely mediated by tumor stem cells [50]. This work shows that radiation treatment fails in the long run because it cannot kill the subpopulation of CD133⁺ tumor-initiating cells. They showed that CD133⁺ cancer stem cells contributed to glioma resistance through preferential activation of DNA damage checkpoint response and an increase in DNA repair capacity compared with CD133⁺ tumor cells. The radioresistance of CD133 glioma stem cells could be reversed with a specific inhibitor of Chk1 and Chk2 checkpoint kinases, which are closely associated with cellular resistance to radiation, thereby providing a therapeutic advantage to reducing brain tumor occurrence. As the cell cycle of a normal stem cell is tightly controlled by the checkpoint to maintain genomic stability and integrity, the defective checkpoint responses associated with early cancer development [54, 55] point to an abnormal checkpoint control as a potential contributor to the transformation of normal cells into cancer stem cells. Therefore, targeting the checkpoint response in CD133⁺ glioblastoma cells may

help to overcome the radioresistance of this tumor. Further studies may confirm a rate-limiting role of DNA repair for the functionality of glioblastoma cells.

Also, Liu et al. demonstrated an increased resistance of CD133-positive brain tumor stem cells in response to treatment with chemotherapeutic agents such as carboplatin, paclitaxel, and etoposide compared with CD133⁻ cells [56]. These studies revealed a higher expression of the multidrug resistance gene BCRP1 and genes that inhibit apoptosis in the CD133-expressing cancer stem cells. The work also showed that CD133 expression was significantly higher in recurrent glioblastomas compared with their respective newly diagnosed tumors. These results suggest that although chemotherapy kills most of the cells in a tumor, NCSCs remain viable and can reappear due to their enhanced chemoresistance.

Regarding the clinical implications of cancer stem cells, Piccirillo et al. were the first to show that human glioblastoma cells expressed BMPs and their cell surface receptors – BMPs being the soluble factors that normally induce neural precursor cells to differentiate into mature astrocytes, a subtype of brain cells called glial cells [33]. These authors showed that BMPs could also promote the differentiation of CD133⁺ brain tumor stem cells, seriously weakening their tumor-forming ability. The results further imply that tumor populations at least partially retain a developmental hierarchy based on stem cells and remain able to respond to the normal signals that induce them to mature. These findings should lead to renewed interest in devising therapies that promote the differentiation of cancer cells.

Future directions

In conclusion, although major questions remain unanswered concerning the origin and function of NCSCs, their existence in glioblastomas is a widely accepted hypothesis. How these NCSCs control cell growth and cell-cycle progression of glioblastomas, however, is not yet clear. Nor is it clear whether there exists a stem-cell-specific machinery that controls growth and proliferation in a variety of stem cell lineages and why stem cell proliferation gets out of control when asymmetric cell division is compromised. Furthermore, the molecular events that occur when such a compromised stem cell becomes unresponsive to growth control signals remain unknown. The striking discovery of stem cell lineages in many tumors, including glioblastomas, might lead to identification of entirely new mechanisms for stem cell control. All data obtained so far suggest that in the coming years, NCSCs will be identified as a powerful new potential therapeutic target, and knowledge of the detailed biology and clinical significance of this noticeably defined population will provide further support for the NCSC hypothesis. Additionally, efforts now focus on the evaluation of target expression profiles in NCSCs in

glioblastomas and on the potential of these cells to resist therapy. Ultimately, focusing research efforts on the NCSC may drive important advances in our understanding of glioblastoma biology and in developing potential cures for this devastating disease.

Acknowledgments

Work in our laboratory is supported by the Ministerio de Educacion y Ciencia grants SAF2004-06263-CO2-01 and SAF2007-62811 and the Comunidad de Madrid grant GR/SAL/0033/2004.

References

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983–3988
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401
- Taylor MD, Poppleton H, Fuller C et al (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8:323–335
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106–110
- Tlsty TD, Hein PW (2001) Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11:54–59
- Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB (2003) Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr Opin Oncol* 15:197–203
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828
- Caussinus E, Gonzalez C (2005) Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 37:1125–1129
- Zhu Y, Guignard F, Zhao D et al (2005) Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* 8:119–130
- Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL et al (2002) Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1:269–277
- Uhrbom L, Dai C, Celestino JC et al (2002) Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res* 62:5551–5558
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433–1438
- Luskin MB, Zigova T, Soteres BJ, Stewart RR (1997) Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate in vitro and express a neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* 8:351–366
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD et al (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* 36:249–266
- Ostenfeld T, Svendsen CN (2003) Recent advances in stem cell neurobiology. *Adv Tech Stand Neurosurg* 28:3–89
- Bartlett PF, Richards LR, Kilpatrick TJ et al (1995) Factors regulating the differentiation of neural precursors in the forebrain. *Ciba Found Symp* 193:85–99; discussion 117–126
- Johe KK, Hazel TG, Muller T et al (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10:3129–3140
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED et al (2002) Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39:193–206
- Berger F, Gay E, Pelletier L et al (2004) Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol* 5:511–514
- Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2004) Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 42:885–888
- Fomchenko EI, Holland EC (2005) Stem cells and brain cancer. *Exp Cell Res* 306:323–329
- Clarke MF (2004) Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature* 432:281–282
- Galli R, Binda E, Orfanelli U et al (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64:7011–7021
- Moore KA, Lemischka IR (2006) Stem cells and their niches. *Science* 311:1880–1885
- Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441:1075–1079
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769–778
- Ailles LE, Weissman IL (2007) Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 18:460–466
- Moinfar F, Man YG, Arnould L et al (2000) Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2562–2566
- Lopez-Otin C, Matrisian LM (2007) Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 7:800–808
- Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ (2007) Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci* 12:3468–3474
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11:69–82
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd et al (2007) Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 13:1253–1259
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N et al (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444:761–765
- Crittenden SL, Leonhard KA, Byrd DT, Kimble J (2006) Cellular analyses of the mitotic region in the *Caenorhabditis elegans* adult germ line. *Mol Biol Cell* 17:3051–3061
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P et al (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449:1003–1007
- Kiel MJ, He S, Ashkenazi R et al (2007) Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449:238–242
- Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:781–786
- Goodell MA, Brose K, Paradis G et al (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183:1797–1806
- Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG et al (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14228–14233
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y et al (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23:9392–9400
- Beier D, Hau P, Proescholdt M et al (2007) CD133(+) and CD133(–) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010–4015
- Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B et al (2008) Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14:123–129
- Pahlman S, Stockhausen MT, Fredlund E, Axelson H (2004) Notch signaling in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 14:365–373
- Purow BW, Haque RM, Noel MW et al (2005) Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 65:2353–2363
- Zhang XP, Zheng G, Zou L et al (2008) Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol Cell Biochem* 307:101–108
- Fan X, Matsui W, Khaki L et al (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 66:7445–7452
- Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709–715
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
- Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS et al (2002) Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16220–16225
- Bao S, Wu Q, McLendon RE et al (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756–760
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F (2006) The response of CD24(–/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 98:1777–1785
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F et al (2007) WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:618–623
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K et al (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434:864–870
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P et al (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434:907–913
- Liu G, Yuan X, Zeng Z et al (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5:67

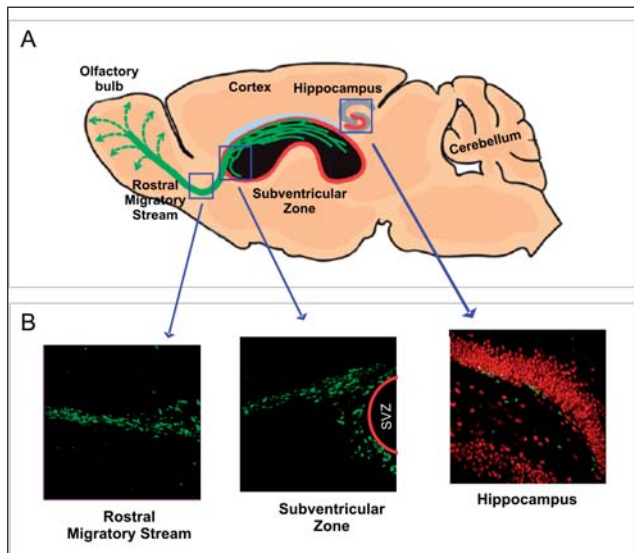


Fig. 1 Neural stem cells niches in the adult human brain. **a** Schematic of a sagittal brain section showing areas in the human brain where neurogenesis takes place. These germinal zones, the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle, are marked in *red*. Neurons formed in the SVZ that migrate to the olfactory bulb (OB) through the rostral migratory stream (RMS) are shown in *green*. **b** Neurogenesis in the adult brain revealed by BrdU incorporation (*green*) in RMS, SVZ, and SGZ. In the SGZ of the hippocampus, granular neurons are stained in *red*

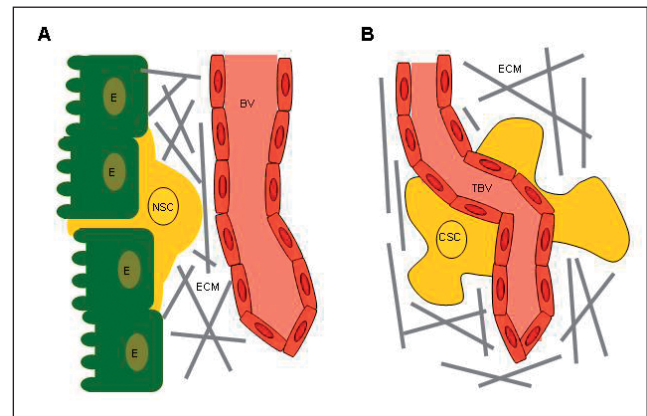


Fig. 2 Normal and tumoral stem cell niche. **a** Schematic of the subventricular zone (SVZ) neural stem cell (NSC) niche. NSCs locate adjacent to ependymal cells (E) and blood vessels (BV). **b** Similarly, glioblastoma cancer stem cells (CSC) are found in contact with tumoral blood vessels (TBV) attracted to the niche by secretion to the extracellular matrix (ECM) of diffusible factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF)

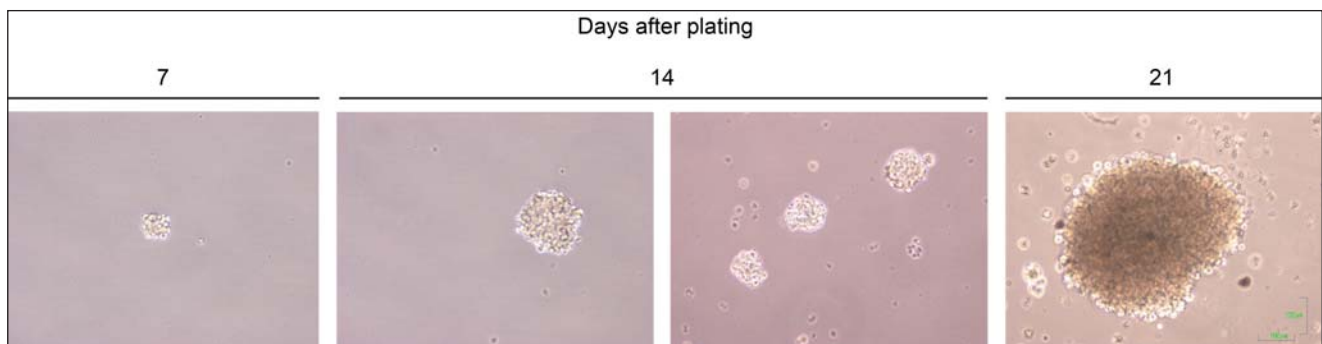


Fig. 3 Neurosphere-forming capacity. Neural cancer stem cells were seeded on low-adherent plates and grown for 21 days in serum-free medium containing basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF)